

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Obstetricia y Ginecología



TESIS DOCTORAL

**Molécula HLA-G y su importancia en la inmunorregulación de la
unidad feto-materna. Aplicaciones en inmunoterapia celular**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Jacqueline Macedo Pereira

Directores

Miguel Ángel Herraiz Martínez
Jorge Martínez Laso
José Antonio Vidart Aragón

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Hospital Universitario Clínico San Carlos

Facultad de Medicina

Departamento de Obstetricia y Ginecología



**"MOLECULA HLA-G Y SU IMPORTANCIA EN LA
INMUNORREGULACION DE LA UNIDAD FETO-
MATERNA.**

APLICACIONES EN INMUNOTERAPIA CELULAR".

Jacqueline Macedo Pereira.

Madrid 2015.

UNIVERSIDAD: Universidad Complutense de Madrid.

FACULTAD Y DEPARTAMENTO:

Facultad de Medicina.

Departamento de Ginecología y Obstetricia.

Hospital Clínico Universitario San Carlos

TITULO:

Molécula de HLA-G y su importancia en la

Regulación de la inmunidad feto-materna.

Aplicaciones en inmunoterapia celular.

AUTOR:

Jacqueline Macedo Pereira.

DIRECTORES DE TESIS:

Dr. Jorge Martínez Laso.

Dr. Miguel Ángel Herraiz Martínez.

Dr. José Antonio Vidart Aragón.

A mi familia, a mi esposo y a mi bebe Álvaro.

"El éxito consiste en obtener lo que se desea.
La felicidad, en disfrutar lo que se obtiene".

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi más sincera gratitud a todas aquellas personas que han participado, de alguna manera, en la realización de esta Tesis Doctoral. Sin su colaboración no podría haberse realizado.

Deseo reseñar con especial cariño e inmensa gratitud a las siguientes personas:

Al Dr. Jorge Martínez Iaso, Jefe de la Unidad de Inmunoterapia Celular del Instituto de Salud Carlos III y Director de esta tesis, por su dedicación continua y su entrega incondicional. Gracias por siempre disponer de tiempo para hablar, de paciencia para escuchar y de maestría para enseñar, además de hacerme comprender el maravilloso y complicado mundo de la Inmunología y transmitirme la pasión por la genética.

Al profesor Miguel Ángel Herraiz Martínez, Jefe de la Sección de Obstetricia y Ginecología del Hospital Clínico San Carlos, Director del Instituto de Salud de la Mujer y Catedrático de Ginecología y Obstetricia de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, director de esta tesis, por su dedicación continua y su entrega incondicional desde mis comienzos en el Hospital. Gracias por la confianza sin límites y por la sabiduría magistral con cada acción, y creer en mi potencial de formación.

Al profesor José Antonio Vidart Aragón, Catedrático de Ginecología y Obstetricia de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de

Madrid y Jefe de Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Clínico San Carlos, co-director de esta tesis. Mi agradecimiento eterno por el gran honor de haberme permitido recibir parte del conocimiento que posee, junto al equipo de adjuntos, y haber iniciado mi formación dentro de la especialidad.

A todo el equipo de becarios y técnicos de laboratorio del Instituto de Salud Carlos III, y muy especialmente a Isabel Cervera Hernández, que me ayudó desinteresadamente en el procesamiento de las muestras de cordón y me enseñó técnicas de laboratorio que desconocía.

A las matronas del Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Clínico San Carlos, por ayudarme a la recogida de las muestras de sangre de cordón y sangre periférica materna, además de su cariño y apoyo profesional y personal. Sin su colaboración este proyecto no se podría llevar a cabo, gracias por su inmensa participación.

A la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Clínico San Carlos y a la Fundación para la Cooperación y Salud Internacional Carlos III por su excelente soporte técnico y la aprobación de los protocolos para la realización de este trabajo de investigación.

Mi especial agradecimiento a todos los amigos que me han apoyado en este proyecto, principalmente a los compañeros, residentes y personal adscrito al Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Clínico San Carlos, que han

cooperado en la extracción de la sangre de cordón umbilical y a todas las pacientes gestantes analizadas en el mismo.

A mi esposo, por estar siempre a mi lado para apoyarme, por haberme ayudado a superar las dificultades encontradas durante esta tesis y mi formación como especialista, y por ser para mí un estímulo aportando consejos y su confianza en el éxito. Eres el Norte y el gran pilar de mi vida. Y a mi bebé Álvaro, lo más hermoso que la vida me ha regalado, la oportunidad de ser mamá a pesar de todas las dificultades.

Finalmente gracias a mi familia, porque con vosotros soy lo que mis sueños me orienten a ser. Ellos me han aportaron ilusión y estímulo para la finalización de esta Tesis Doctoral. A mi papá, en el cielo, que me bendiga y que me guíe a través de Dios. Siempre decía: " no te angusties, vive la vida con calma".

ÍNDICE	8
ABREVIATURAS	12
RESUMEN	14
INTRODUCCIÓN	
I. Inmunología Básica.....	22
II. Características del sistema inmune materno-fetal.....	29
III. Constitución del trofoblasto. Anatomía de la Interfase.....	31
III.1 Etapa Prelacunar.....	33
III.2 Etapa Lacunar.....	33
IV. Compartimientos y tipos celulares del trofoblasto.....	35
IV.1 Sincitiotrofoblasto.....	35
IV.2 Citotrofoblasto.....	36
IV.3 Decidua.....	36
V. Generalidades del sistema inmune y el trofoblasto.....	37
VI. Interfase materno-fetal.....	39
VII. Inmunorregulación de la gestación.....	41
VII.1 Celular.....	41
VII.1.1 Modificaciones de la decidua materna.....	43
VII.1.2 Ambiente TH2 en la gestación.....	50
VII.2 Humoral.....	52
VII.3 Hormonal.....	54
VIII. Complejo Mayor de Histocompatibilidad.....	57

VIII.1 Tipos de moléculas HLA.....	58
VIII.1.1 Moléculas HLA clase I. Proteínas y genes.....	59
VIII.1.2 Moléculas HLA de clase II. Proteínas y genes.....	62
VIII.2 Características generales del HLA.	64
VIII.2.1 Polimorfismo.....	65
VIII.2.2 Desequilibrio de ligamento.....	69
VIII.2.3 Reacción cruzada.....	69
VIII.2.4 Restricción de la localización tisular.....	70
VIII.3 Funciones del HLA.....	71
VIII.3.1 Presentación antigénica HLA clase I.....	72
VIII.3.2 Presentación antigénica HLA clase II.....	73
VIII.3.3 Otras moléculas HLA.....	74
VIII.4 Aplicaciones del HLA.....	77
VIII.4.1 Médicas.....	77
VIII.4.1.1 Enfermedades autoinmunes.....	77
VIII.4.1.2 Tumores.....	80
VIII.4.1.3 Trasplantes.....	82
VIII.4.1.4 Infecciones virales.....	86
VIII.4.1.5 Inflamación.....	88
VIII.4.1.6 Medicina regenerativa.....	90
VIII.4.1.7 Reproducción asistida.....	91
VIII.4.1.8 Vacunas.....	93
VIII.4.1.9 Medicina preventiva.....	95
VIII.4.2 No médicas.....	96

VIII.4.2.1 Medicina Legal.....	96
VIII.4.2.2 Antropología.....	96
VIII.5 Expresión HLA-G.....	97
VIII.6 Isoformas HLA-G.....	98
VIII.7 Determinación de nuevos alelos HLA-G.....	102
VIII.8 Determinación del polimorfismo 14bp	111
VIII.9 HLA-G y gestación.	113
VIII.10 HLA-G y patología obstétrica.....	115
VIII.10.1 Preeclampsia.	115
VIII.10.2 Abortos de repetición.....	117
VIII.10.3 Fallos de implantación.....	118
VIII.10.4 Amenaza de parto pretérmino.	119
VIII.10.5 Desprendimiento de placenta... ..	120
IX. Generalidades sobre células madre.....	120
IX.1 Ventajas de las células madre del cordón umbilical.	122
X. Caracterización de las células hematopoyéticas del cordón.....	123
X.1 Células madre.....	123
X.2 Células dendríticas.	125
HIPOTESIS	130
OBJETIVOS	134
PACIENTES	
I. Período de estudio.....	138
II. Población de estudio.....	138

II.1 Criterios de inclusión.....	138
II.2 Criterios de exclusión.....	139

MÉTODOS

I. Metodología clínica.....	141
I.1 Técnica de extracción de sangre de cordón.....	141
I.2 Procesamiento de muestras.....	142
I.3 Estudio celular.....	143
I.3.1 Extracción de subpoblaciones.....	143
I.3.1.1 Gradiente de densidad.....	143
I.3.1.2 Transformación de CD34 en dendríticas.....	147
I.3.2 Citofluorometría de flujo.....	148
I.4 Estudio de proteínas.....	152
I.4.1 Cuantificación de HLA-G soluble.....	152
I.5 Estudio genético.....	155
I.5.1 Expresión génica de isoformas HLA-G.....	155
I.5.1.1 Aislamiento de mRNA y PCR.....	155
I.5.1.2 Secuenciación de transcritos HLA-G.....	163
I.5.1.3 Secuenciación de nuevos alelos HLA-G.....	165
II. Metodología estadística.....	166

RESULTADOS

I. Estudio descriptivo.....	168
II. Estudio analítico.....	170

II.1 Expresión de proteínas HLA-G en diferentes subtipos de células de sangre de cordón umbilical.....	170
II.1.1 Expresión intracelular y superficial de HLA-G en células madre CD34+.....	170
II.1.2 Expresión intracelular y superficial de HLA-G en células dendríticas.....	182
II.1.3 Expresión intracelular y superficial de HLA-G en células dendríticas derivadas de células madre CD34+.....	185
II.1.4 HLA-G soluble en suero de sangre de cordón.....	187
II.2 Expresión de las distintas isoformas de HLA-G en sangre de cordón umbilical.....	189
II.2.1 Expresión de isoformas HLA-G en células CD34+.....	190
II.2.2 Expresión de isoformas HLA-G en células dendríticas...	191
II.2.3 Expresión de isoformas HLA-G en células dendríticas derivadas en el laboratorio a partir de CD34+.....	193
II.3 Descripción de nuevos alelos HLA-G.	193
II.4 Correlación de los polimorfismos 14 bp/indel	198
II.4.1 Filogenia HLA-G.....	198

DISCUSION

I. Expresión de HLA-G en células CD34+.....	207
II. Expresión de HLA-G en células dendríticas.....	208
III. Expresión de HLA-G en dendríticas derivadas de CD34+.....	210
IV. Distribución de distintas isoformas de HLA-G.....	212

V. Filogenia y nuevos alelos HLA-G.....	214
VI. Polimorfismo 14bp/indel y su relación con HLA-G.....	215
VII. Aplicaciones en inmunoterapia celular.....	217
 CONCLUSIONES.....	 222
ANEXOS.....	226
BIBLIOGRAFIA.....	233

ABREVIATURAS

CSF-1: Factor Estimulador de Colonias 1.

GM-CSF: Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Monocitos.

HLA: Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

Ig: Inmunoglobulina.

IL: Interleuquina.

INF γ : Interferón γ .

LIF: Factor Inhibidor de Leucocitos.

KIR: Receptor de NK inhibitorio.

MIF: Factor Inhibidor de la migración de Macrófagos.

NK: Natural Killers.

PAPP-A: proteína plasmática A asociada al embarazo.

PDGF: Factor de Crecimiento derivado de las Plaquetas.

PIGF: Factor de Crecimiento de Placenta.

TcR: Receptor de células T.

TGF- β 2: Factor transformador de crecimiento.

TNF α : Factor de Necrosis Tumoral α .

RESUMEN

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis doctoral consiste en determinar la presencia de la proteína HLA-G en la superficie celular de células madre CD34/CD133, células dendríticas mieloides y plasmacitoides, células dendríticas derivadas de células CD34/CD133 y derivadas de monocitos de sangre de cordón umbilical y sangre periférica materna, por técnicas de citometría de flujo y la expresión de la proteína HLA-G soluble en plasma de sangre de cordón umbilical por técnicas de ELISA.

MATERIALES Y METODOS

Se obtuvo un total de 35 unidades de sangre de cordón umbilical y 35 muestras de sangre periférica de gestantes a término que acudieron al Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Clínico Universitario San Carlos con cesáreas programadas, según aprobación de Comité Ético. Se realizaron técnicas de cultivo celular, citometría de flujo, Elisa y anticuerpos monoclonales, según protocolo, para la obtención de las células madre CD34+, células dendríticas mieloides y plasmacitoides del cordón umbilical y células dendríticas derivadas de células madre CD34+, y determinación de la molécula HLA-G, isoformas, nuevos alelos y polimorfismos.

RESULTADOS

Se confirmó la presencia de HLA-G intracelular y superficial en las tres subpoblaciones de células madre CD34 (CD34+/CD133+, CD34+/CD133-, CD34-/CD133+), por citometría de flujo, además de la presencia de HLA-G y CD1d en aquellas subpoblaciones de células madre hematopoyéticas que expresaban CD1a en las muestras de los cordones umbilicales, probables precursoras de células dendríticas.

Se determinó la medida de expresión génica de superficie e intracelular de las isoformas HLA-G tanto en las células madre de cordón umbilical y en los subtipos de células dendríticas. Se observó la presencia de mRNA de HLA-G en las células dendríticas y se aisló las isoformas G1 que es la más completa y de superficie y la isoforma G5 que es la soluble. Se han descrito nuevos alelos HLA-G por el polimorfismo molecular.

CONCLUSIONES

HLA-G es una molécula clase I no clásica (clase Ib) del Complejo Mayor de Histocompatibilidad Humano que adopta 7 isoformas, resultado del empalme alternativo de un mismo mRNA inmaduro. Se expresa de forma selectiva en la interfase materno-fetal (trofoblasto, células endoteliales fetales y líquido amniótico). Las características del sistema inmune fetal son: baja incidencia de enfermedad del injerto contra huésped en el trasplante de sangre de cordón

umbilical, el papel del HLA-G en la tolerancia materno-fetal y el alto grado de inmadurez en la sangre de cordón umbilical. Los alelos HLA-G y los niveles de expresión de las proteínas se asocian con patologías de la gestación y se expresa patológicamente en tejidos trasplantados, tumores, inflamaciones e infecciones virales. Los estudios van dirigidos a controlar las interacciones HLA-G/NK en la inducción de un estado de tolerancia inmunitaria. Estas características se pueden aplicar a la inmunoterapia celular.

PALABRAS CLAVE

HLA-G, polimorfismo, sangre de cordón umbilical, trasplante.

SUMMARY

OBJECTIVE

The objective is to determine the presence of the HLA-G protein on the cell surface of stem cells CD34/CD133, myeloid and plasmacytoid dendritic cells, dendritic cells derived from CD34/CD133 and derived from blood monocytes cord and maternal peripheral blood by flow cytometry techniques and expression of soluble HLA-G protein in plasma from umbilical cord blood by ELISA.

MATERIALS AND METHODS

A total of 35 units of cord blood and peripheral blood samples from 35 pregnant women at term who attended Gynaecology and Obstetrics department, San Carlos Hospital with scheduled caesarean sections were made according Ethics Committee approval. Determining the molecule cell culture techniques performed, flow cytometry, ELISA and monoclonal antibodies, according to protocol, for obtaining CD34+ cells, myeloid dendritic cells and plasmacytoid cord and dendritic cells derived from CD34+ stem cells, and HLA-G isoforms, new alleles and polymorphism.

RESULTS

The presence of HLA-G intracellular and surface in three subpopulations of stem cells CD34 (CD34+/CD133+, CD34+/CD133-, CD34-/CD133+) was

confirmed, by flow cytometry, besides the presence of HLA-G and CD1d those subpopulations of hematopoietic stem cells expressing CD1a in samples of umbilical precursor, dendritic cell cords.

Measuring gene expression and intracellular surface of HLA-G isoforms both stem cells and umbilical cord subtypes of dendritic cells was determined. The presence of HLA-G was observed in dendritic cells and G1 isoforms is the most complete and surface and G5 is the soluble isoforms was isolated. We describe new HLA-G alleles by molecular polymorphism.

CONCLUTIONS

HLA-G is a nonclassical class I molecule (class Ib) Major Histocompatibility Complex Human adopting seven isoforms resulting from alternative splicing of the same immature mRNA. It is expressed selectively in the maternal-fetal interface (trophoblast, fetal endothelial cells and amniotic fluid).

The characteristics of the fetal immune systems are: low incidence of graft versus host disease in transplantation of umbilical cord blood, the role of HLA-G in maternal-fetal tolerance and high degree of immaturity in cord blood. HLA-G expression levels of proteins alleles are associated with pathologies of pregnancy and are expressed pathologically in transplanted tissues, tumors, inflammation and viral infections. Studies are directed to control HLA-G/NK interactions in the induction of a state of immune tolerance. These features can be applied to cellular immunotherapy.

KEYWORDS

HLA-G, polymorphisms, cord blood, transplant.

INTRODUCCIÓN

I. INMUNOLOGIA BASICA

La Inmunología es uno de los grandes pilares de la fisiología del embarazo, constituyendo una llave a la comprensión de muchos procesos patogénicos. La enorme complejidad de sus mecanismos explica el desconocimiento de los médicos clínicos por esta ciencia.

El embarazo ha sido considerado como una paradoja inmunológica¹, dado que el feto posee hasta un 50% de la información genética procedente del padre, expresando aloantígenos, los cuales serían susceptibles de reconocimiento y rechazo por parte del sistema inmune materno. Para la madre, el feto representa algo parecido a un trasplante, y se comportaría como un semialoinjerto². Las leyes que rigen el trasplante inmunológico se ponen en entredicho, ya que habitualmente el rechazo no se produce³. Muchos de los mecanismos para prevenir la respuesta inmune se encuentran en la interfase materno-fetal y hoy se conoce que uno de los más importantes es el HLA-G⁴.

El sistema inmune se encarga de proteger al organismo frente a organismos patógenos o sustancias extrañas. Existen dos tipos de respuesta: la innata y la adquirida (Figura 1).

La **inmunidad innata o natural** carece de especificidad, no tiene memoria y es la primera línea de defensa. Se incluyen barreras físicas (epitelio, flora

bacteriana) químicas (mucus, enzimas), celulares (macrófagos, células natural killer, neutrófilos) y mediadores como el complemento y citoquinas.

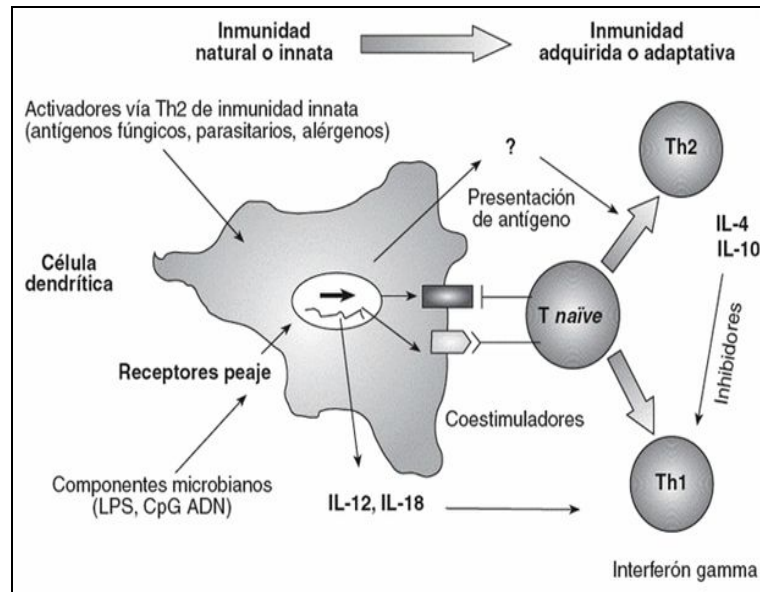


Figura 1. Tipos de respuesta inmunológica, García-Lechuz⁵.

Los **macrófagos** reciben el nombre de histiocitos en los tejidos o monocitos principalmente en la sangre. Se activan por lipopolisacáridos, $\text{INF}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$ y secretan IL-1, IL-6, $\text{TNF}\alpha$ e $\text{INF}\alpha$ y β . Son células presentadoras de antígeno y fagocitan residuos celulares.

Las células **Natural Killer** (NK) son linfocitos granulares grandes, no B no T, con receptores para IL-2, IL-12, $\text{TNF}\alpha$ e $\text{INF}\alpha$. Se encargan de la inmunidad celular en el compartimiento vascular, la producción de $\text{TNF}\alpha$, la citotoxicidad inespecífica mediada por IL-12 e IL-2 y anticuerpos IgG.

La **inmunidad adquirida** necesita una sensibilización previa de los linfocitos, produce una respuesta específica variable con el tiempo y tiene memoria. Dentro de la inmunidad adquirida existen dos clases de respuestas dependiendo del proceso que la origine: la **respuesta inmune humoral** y la **respuesta inmune celular**.

La **respuesta inmune humoral** es el principal mecanismo de defensa contra los microorganismos extracelulares y sus toxinas, y se producen anticuerpos secretados por activación antigénica que los destruye.

La **respuesta inmune celular** es una forma de respuesta adaptativa mediada por linfocitos T. Actúa como mecanismo de ataque en contra de microorganismos intracelulares, como virus y algunas bacterias, capaces de proliferar en el interior de fagocitos y otras células del huésped, donde no tienen acceso los anticuerpos circulantes.

Dentro de la respuesta inmune celular las células más importantes son:

- **Linfocitos B:** se transforman en células plasmáticas al ser atacadas por un antígeno HLA independiente. Producen anticuerpos específicos contra ese antígeno, y forman linfocitos B memoria.

- **Linfocitos T** se producen en la médula ósea y maduran en el timo. Responden a la presentación HLA dependiente de antígenos titulares y de

membranas celulares. Al activarse el linfocito T aparecen en su superficie moléculas coestimuladoras cuyos ligandos en las células presentadoras de antígeno son las moléculas B7.1/ B7.2 o CD80/CD86.

Hay dos subtipos de linfocitos T (Figura 1), los **CD4+ helper (colaboradores)** y los **CD8+ o citotóxicos (supresores)**. Las CD4+ ayudan a los linfocitos B y T CD8+, por lo que su acción es indirecta. Los antígenos deben ser presentados con las moléculas HLA clase II. Dentro de los CD4+ existen dos subclases (Figura 2):

TH1: sintetizan INF γ , inhibe la producción de IL-4 por las TH2, favorecen la respuesta celular gracias a la IL-12 segregada por los macrófagos, participan en la hipersensibilidad retardada y defensa frente a patógenos intracelulares⁵.

TH2: producen IL-4, IL-5, IL-6 y IL-10, inhiben la producción de INF γ y participan en las reacciones de hipersensibilidad inmediata y defensa frente a parásitos.

Los linfocitos T CD8+ destruyen células que fagocitan los antígenos no propios asociados a HLA clase I producidos dentro de la propia célula. Impiden la acción de los linfocitos T y B.

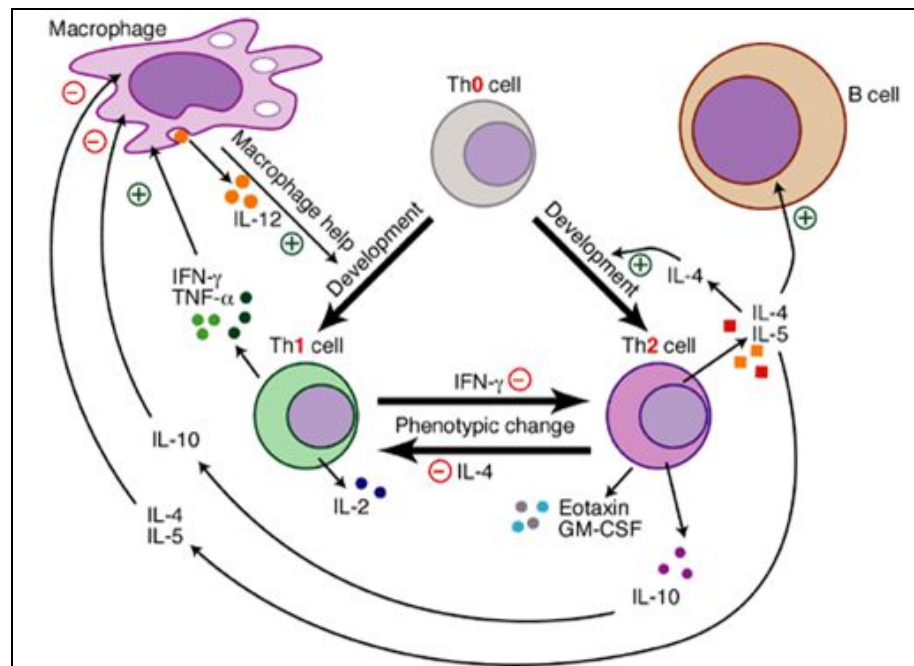


Figura 2. Respuesta TH1 Y TH2, Mitra *et al* ⁶.

Las sustancias que sintetizan esas células efectoras son las siguientes:

Citoquinas: son proteínas de bajo peso molecular que se segregan de forma autocrina y paracrina. Existen interleuquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, TNF α , IL-2, IL-12, INF γ , TNF β e IL-16. Otras son antiinflamatorias como son IL-10, INF α y β . La principal citoquina es la IL-8.

Proteínas de complemento: son sintetizadas por macrófagos y hepatocitos. Actúan como una cascada de 20 proteínas plasmáticas que forman complejos de ataque de la membrana de células extrañas. Existen dos vías de activación: la *vía clásica*: (inmunocomplejos y lipopolisacáridos bacterianos) y la *vía alternativa* (microorganismos e inmunoglobulinas). El sistema de complemento

tiene capacidad de autoamplificación por lo que existen mecanismos regulatorios.

Anticuerpos: son proteínas sintetizadas por las células plasmáticas, poseen cuatro cadenas, dos ligeras y dos pesadas unidas por una zona bisagra. Por un extremo se unen al antígeno (cada una posee dos segmentos Fab idénticos) y por el otro a células fagocíticas, mastocitos y basófilos (región Fc). Neutralizan el antígeno patógeno, producen opsonificación que consiste en aumentar la afinidad de los antígenos para ser destruidos y activan de forma indirecta el complemento.

Moléculas CD1: Se denomina CD1 a un tipo de molécula presentadora de antígenos no clásica, ya que la información no se encuentra dentro de la región codificante para los complejos clásicos I y II. Se caracteriza por poseer un peso molecular de 43-49 kDa. Su función biológica es presentar antígenos lipídicos a los linfocitos NKT. Estos linfocitos expresan marcadores característicos de linfocitos citolíticos naturales y receptores de células T⁸.

La proteína CD1 posee similitud con el Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I en cuanto a su organización de subunidades y a su asociación a microglobulina B2, sin embargo, se comporta como una molécula clase II con respecto a la forma que adquiere sus ligandos.

Los antígenos presentados por CD1 son moléculas glicolipídicas antipáticas, con una cabeza hidrofílica con grupos polares y una cola hidrofóbica con una o

dos cabezas hidrocarbonaras ⁸. La presentación de antígenos por moléculas CD1 a los linfocitos T muestra semejanza con el reconocimiento antigénico de los complejos péptido/HLA.

Se expresa en timocitos corticales, células de Langerhans, dendríticas, linfocitos B, epitelio intestinal, músculo liso y endotelio de vasos sanguíneos. Las moléculas CD1 sintetizadas en el retículo endoplásmico se asocian a un glicolípido endógeno y viaja a la superficie celular⁸. Posteriormente, la molécula CD1 se internaliza dentro de compartimientos endosomales en donde los lípidos endógenos son removidos y un glicolípido es colocado en su lugar. CD1 regresa a la superficie celular y potencialmente presentará glicolípidos extraños (Figura 3). Los linfocitos NKT que reconocen los antígenos lipídicos pueden intervenir en la defensa frente a micobacterias.

Los antígenos de origen glicolípido, tanto exógeno como endógeno, pueden ser presentados por moléculas CD1. Los que tienen grandes cadenas requieren la ruptura enzimática de enlaces covalentes liberando pequeños fragmentos antigénicos que pueden ser reconocidos por células T.

Las moléculas CD1 se clasifican en grupo 1 y 2, con 5 isoformas, de acuerdo a la secuencia homóloga:

Grupo 1: comprenden los tipos CD1a, CD1b y CD1c. Estas proteínas se unen a glucolípidos, fosfolípidos y antígenos lipopeptídicos derivados de microbios. Las moléculas CD1a se expresan en células dendríticas derivadas de monocitos y las células de langerhans, las CD1b en las células dendríticas

derivadas de monocitos y las CD1c en las dendríticas y activan los linfocitos T autorreactivos.

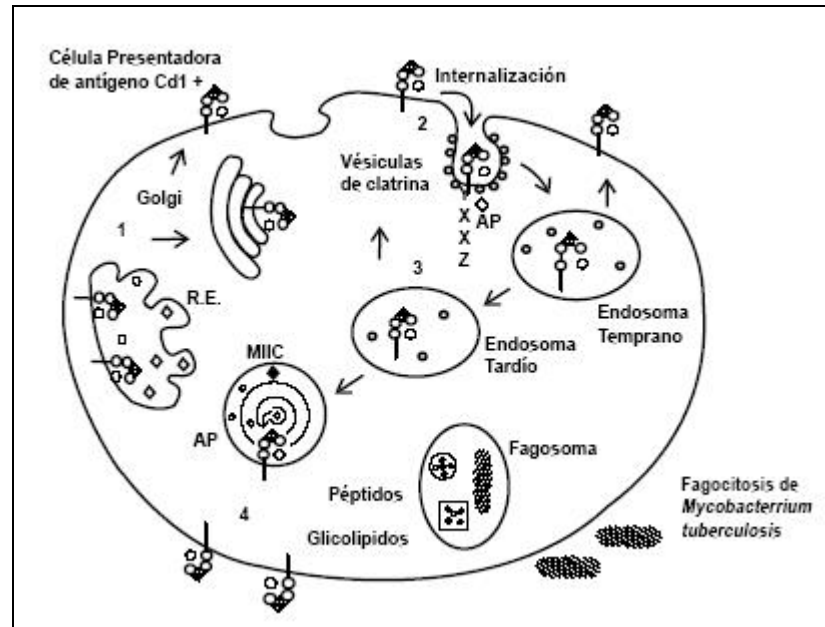


Figura 3. Procesamiento y localización intracelular de las proteínas CD1 en una célula presentadora de antígeno, Litman *et al*⁸.

Grupo 2: por los tipos CD1d y CD1e. Se unen a antígenos lipídicos como esfingolípidos y diacilgliceroles. La molécula CD1d se localizan en endosomas tardíos y la CD1e se expresa intracelular y no ha sido asociada a la activación de linfocitos T.

II. CARACTERÍSTICAS DEL SISTEMA INMUNE MATERNO-FETAL

Existen mecanismos biológicos de regulación de la respuesta inmune que se concretan en la relación materno-fetal cuyas características empíricas son: baja incidencia de la enfermedad injerto contra huésped en el trasplante de sangre de cordón umbilical incluso con baja compatibilidad HLA respecto al de médula

ósea o de precursores de sangre periférica^{9,10}, alto grado de inmadurez de las células dendríticas en la sangre de cordón umbilical¹⁰, el posible papel de los antígenos no clásicos HLA-G, HLA-E y HLA-F en la tolerancia materno-fetal¹¹ así como la actividad de inhibición de células NK y la expresión de CD1d en las células dendríticas como regulador de activación e inhibición del sistema inmune vía células NK¹².

En esta relación materno-fetal existen otros mecanismos de regulación presente en los eritrocitos fetales que aparecen en el torrente sanguíneo materno a partir de la octava semana de embarazo con características muy especiales: son nucleadas, no son destruidas por el sistema inmune de la madre incluso con un 50% de incompatibilidad y sobreviven durante el embarazo. Cabe pensar que existe algún mecanismo de tolerancia de las mismas¹³.

La placenta de los mamíferos ha estado sujeta a dos presiones opuestas durante la evolución: eliminar los mecanismos patógenos y proteger al feto del rechazo inmunitario. Little en 1924 propuso que el feto no tenía ninguna característica suficientemente individual para ser reconocido como extraño por la madre¹⁴. Billingham y Mendawar en 1953 propusieron 4 razones por la que el feto no produce reacción inmunológica de la madre: la separación anatómica, la inmadurez antigénica del feto, el útero considerado como santuario inmune y la disminución de la respuesta inmune del organismo materno¹⁴.

Los aloantígenos fetales son reconocidos por el sistema inmune materno e induce tolerancia en los linfocitos T y B específicos. Para que la gestación tenga éxito desde el punto de vista inmunológico necesita la interacción de varios factores: hormonas, citoquinas, e inmunosupresores, siendo uno de ellos el **Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC)**, del inglés Major Histocompatibility Complex^{2,15}. En la Figura 4 observamos los componentes de la interfase materno-fetal.

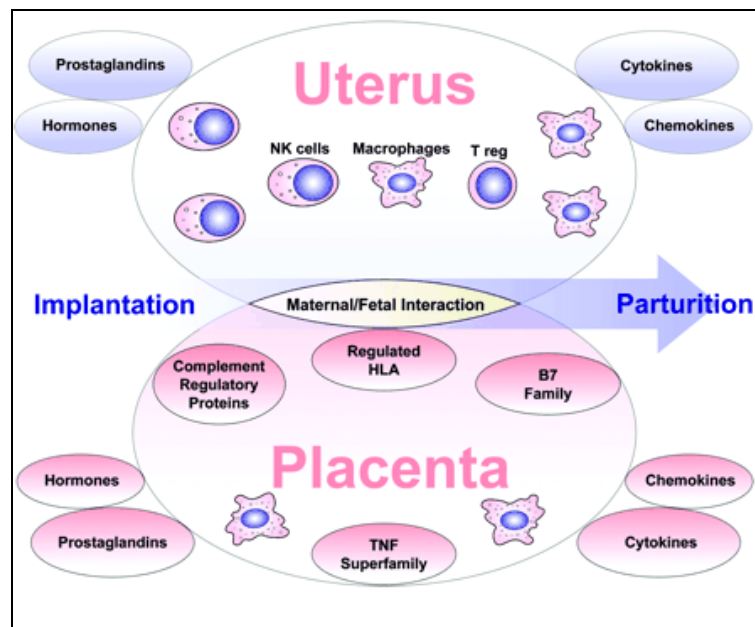


Figura 4. Componentes de la interfase materno-fetal, Hammer *et al*¹⁵.

III. CONSTITUCION DEL TROFOBlasto. ANATOMIA DE LA INTERFASE

III.1 ETAPA PRELACUNAR

La fertilización se inicia con el reconocimiento y fusión de dos células haploides que originan una célula diploide. Las moléculas de clase II del HLA son

necesarias para la adhesión celular y fusión del espermatozoide con el óvulo para la formación del embrión con su nueva carga genética¹⁶.

La implantación del embrión ocurre cuando el blastocisto se adosa al revestimiento endometrial decidualizado por su polo embrionario a los 6 días de la fecundación. Inicia una rápida proliferación celular con diferenciación del trofoblasto en dos capas celulares: una interna de células mononucleares llamadas ***citotrofoblasto*** y otra externa que es una espesa masa citoplasmática multinucleada en contacto con la decidua que es el ***sincitiotrofoblasto***¹⁷ (Figura 5).

El trofoblasto inicial se extiende a través del epitelio endometrial hasta invadir su estroma. Las células que rodean el sitio de implantación se cargan de lípidos y glucógeno, adoptan una forma poliédrica y se definen como células deciduales¹⁹.

El blastocisto se implanta de manera superficial en la capa compacta del endometrio hacia finales de la primera semana. El trofoblasto invade en miometrio circundante hasta que queda incluido en la decidua. Se forman las conexiones capilares para vascularizar el embrión y aportarle nutrición. La sangre materna invade los espacios lacunares del trofoblasto y fagocita grandes cantidades de células sanguíneas²⁰.

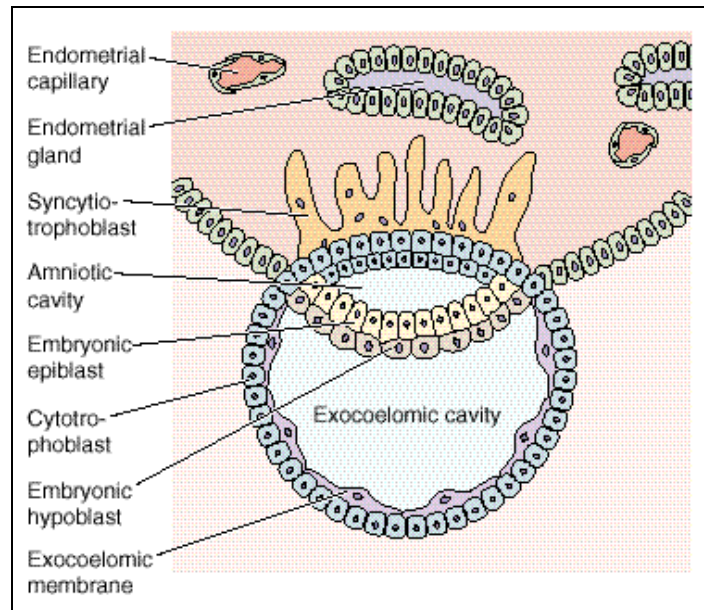


Figura 5. Citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto, Rabreau *et al*¹⁸.

Las funciones del sincitiotrofoblasto son: producir hormonas placentarias, tráfico de células materno-fetales y ofrecer una barrera de resistencia al ataque de anticuerpos y células T citotóxicas²¹. El citotrofoblasto ancla la placenta al útero, amplía las arterias uterinas espirales para la perfusión sanguínea y presenta las células hematopoyéticas para la protección del feto semialogénico.

III.2 ETAPA LACUNAR

Gracias a la acción corrosiva y al intento de invadir el sincitiotrofoblasto en la etapa lacunar, se crean en su espesor espacios rodeados de tejido sincitial que son las columnas sincitiales (Figura 6). El citotrofoblasto subyacente comienza a evaginarse hacia el sincitiotrofoblasto (vellosidad primaria) y posteriormente le sigue el mesodermo extraembrionario y aparecen los islotes vasculares (vellosidad secundaria). La capacidad lítica del sincitiotrofoblasto hace que los

vasos sanguíneos maternos se rompan, y las lagunas estén llenas de sangre materna. La vellosidad terciaria está compuesta por sincitiotrofoblasto, citotrofoblasto, mesénquima extraembrionario y vasos en su eje conectados con la circulación umbilico-alantoidea, ocurriendo en el día 21 post-fecundación²². Algunas de estas vellosidades no se vascularizan, crecen hasta llegar a la cara materna del espacio intervelloso y sirve como anclaje a la decidua.

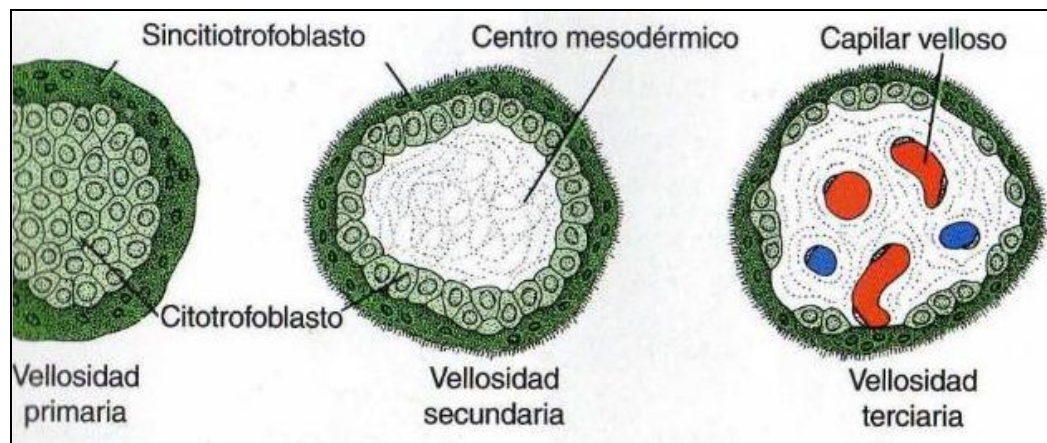


Figura 6. Tipos de vellosidades coriales, Carter *et al*²³.

Las células NK deciduales liberan IL-8 y citoquinas que se unen a los receptores del trofoblasto promoviendo su invasión hacia las arterias espirales, además que producen factores angiogénicos como el VEGF y PIGF que inducen el desarrollo vascular y la circulación placentaria²⁴.

El citotrofoblasto ancla el corion embrionario al endometrio materno²⁵ y penetra en el mesénquima alcanzando las arterias espirales, que muestran edema endotelial y destrucción de la capa muscular media sustituida por material

fibrinoide. Las arterias espirales se convierten en vasos flácidos que no responden a sustancias vasoactivos y tienen gran capacitancia. El antígeno HLA-G y HLA-C actúan como mediadores de tolerancia impidiendo la acción de las células NK. Los sistemas antigénicos HLA-I (A, B y C) y HLA-II (DR, DQ y DP) clásicos no están presentes en el trofoblasto. En la interfase decidual hay actividad linfocítica, lo cual indica que se produce una respuesta inmunitaria específica en este tejido (Figura 7).

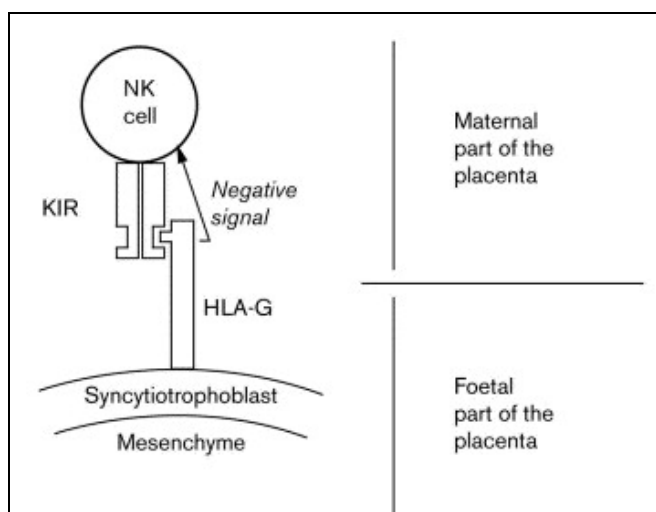


Figura 7. HLA-G y sincitiotrofoblasto, Rodgers *et al*²⁶.

IV. COMPARTIMENTOS Y TIPOS CELULARES DEL TROFOBLASTO

Hay muchos tipos de células de trofoblasto que inician la homeostasis inmune:

IV.1 Sincitiotrofoblasto: se desarrolla a partir del citotrofoblasto por agregación o fusión en un sincitio. En este proceso de fusión participan fosfolípidos como moléculas de adhesión. Funciona como una membrana de diálisis que participa en intercambios bidireccionales de moléculas y nutrientes, y expone directamente la sangre materna a los efectores inmunes. Protege el

feto de mecanismos autoinmunes y citotóxicos. Las células del sincitio y citotrofoblasto veloso no expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad²⁷.

IV.2 Citotrofoblasto: existen los siguientes tipos:

- *Células de anclaje del citotrofoblasto:* unen la placenta a la decidua materna y están en contacto directo con este tejido.
- *Citotrofoblasto extraveloso:* migra y reside en el tejido uterino materno, expresa HLA-G y son las únicas células fetales que entran en contacto con la circulación materna y estimulan los linfocitos maternos contra las diferencias antigénicas del HLA paterno²⁸.
- *Trofoblasto endovascular:* el citotrofoblasto (trofoblasto extraveloso) expresa un HLA no clásico (HLA-G) que se une a los principales receptores de las células NK e inhiben su función citotóxica. Rodean las arteriolas maternas y los linfocitos granulares grandes en la decidua uterina sintetizan óxido nítrico que induce la relajación del músculo liso. El trofoblasto de las vellosidades coriales escapa al reconocimiento inmune por no presentar en su superficie celular moléculas HLA de clase I y II clásicas²⁹.
- *Trofoblasto coriónico:* forman el amniocorion. Sirve para unir la membrana amniótica que contiene el líquido amniótico a la línea uterina.

IV.3 Decidua: ayuda a preparar el endometrio para la implantación del huevo e impedir su rechazo. En la decidua se encuentran los mecanismos celulares

inmunosupresores. La decidua, el estroma epitelial, el timo y la médula ósea es un sitio de migración, desarrollo y funcionamiento de linfocitos y células NK. El contenido de linfocitos TH1 y TH2 es escaso en este compartimiento, apenas un 15%³⁰. El factor inhibidor es la prostaglandina E2 y este mediador de la inflamación regula la expresión de IL-1 en los linfocitos T, siendo estos fundamentales en la respuesta inmunitaria específica citotóxica³¹.

V. GENERALIDADES DEL SISTEMA INMUNE Y EL TROFOBLASTO.

El trofoblasto expresa moléculas de HLA-G polimórfico de clase I (Figura 8), que se encargan de la supresión inmune y la producción de citoquinas que promueven el crecimiento celular. Esto hace que la placenta sea un órgano privilegiado, resistente al daño inmune por linfocitos, anticuerpos citotóxicos y complejos antígenos-anticuerpo³².

El trofoblasto forma una barrera física a la mayoría de efectores inmunes excepto anticuerpos de tipo IgG, los cuales se unen a receptores IgG en la placenta y son transportados al feto desde las etapas más tempranas del embarazo. Recluta la migración de linfocitos a la decidua uterina y liberan factores supresores que restringen los linfocitos citotóxicos³⁴.

Además induce una variedad de anticuerpos en la madre que son capaces de dirigir la reactividad inmune a aloantígenos paternos. Estos anticuerpos regulan células NK citotóxicas a través de la unión del receptor Fab. También actúa como una membrana inmunoabsorbente que se une a anticuerpos que pueden

activar reguladores de crecimiento y establecer un camuflaje inmune que bloquee el arco reflejo inmunológico. En la Figura 9 observamos los receptores potenciales en las células inmunes, dianas para la molécula HLA-G.

	MHC de clase I		MHC de clase II
	HLA-G	HLA-A, -B, -C	HLA-DR, -DP, DQ
Ovocito	-	-	-
Esperma	-	-	-
Blastocisto	+	?	?
Sincitiotrofoblasto	-	-	-
Citotrofoblasto vellositario	-	-	-
Citotrofoblasto extravellositario	+	-	-
Tejido fetal	-	+	+

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad (*major histocompatibility complex*); -, antígeno ausente; +, antígeno presente; ?, aún desconocido.

Figura 8. Expresión del HLA en el desarrollo humano, Falfan *et al*³³.

En mujeres con abortos de repetición y fallos de implantación, la protección del trofoblasto no se establece de esta manera, por lo que los procesos inmunes celulares y humorales se activan impidiendo el desarrollo normal de la gestación³⁶.

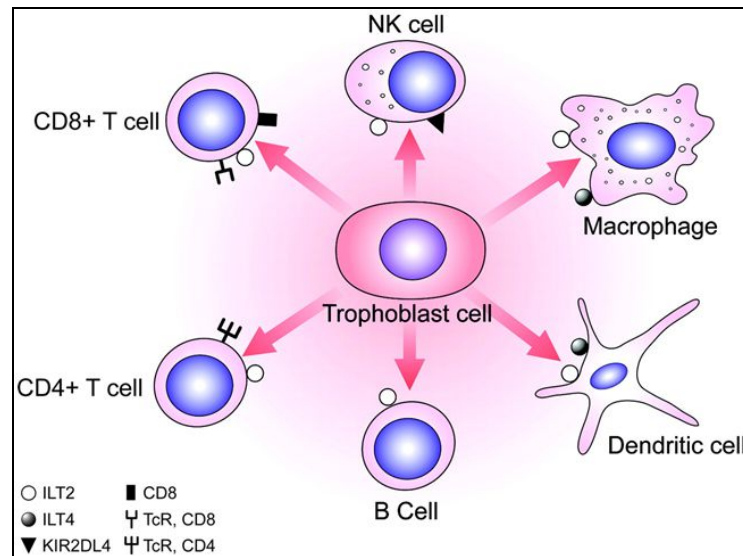


Figura 9. Receptores de las células inmunes, Soares *et al* ³⁵.

Los antígenos HLA-II (Figura 11 y apartado VIII), pueden hallarse en el estroma de las vellosidades coriales y en el tejido conectivo, por debajo del epitelio amniótico. El corion los separa de las células T maternas, haciendo imposible la activación de una respuesta citotóxica³⁷.

V.I INTERFASE MATERNO-FETAL

Existen diversos lugares donde el sistema inmunitario materno puede ponerse en contacto con el feto e iniciar teóricamente el mecanismo de rechazo del aloinjerto³⁰. Esta interfase materno-fetal está compuesta por el trofoblasto placentario (que expresa IL-10, GM-CSF y FAS ligando) y la decidua materna³⁸ (Figura 10).

El contacto puede producirse en el lugar donde el blastocisto se relaciona con el endometrio para implantarse, en el espacio intervelloso con la sangre

materna y cubierto por el sincitiotrofoblasto, y entre el citotrofoblasto extraveloso y las células del sistema inmune presentes en la decidua. La decidua es el sitio donde hay mayor reconocimiento inmune del trofoblasto y el lugar con mayor población de células del sistema inmune: 40% de linfocitos granulares grandes, un 20% de macrófagos y un 10% de linfocitos T³⁹.

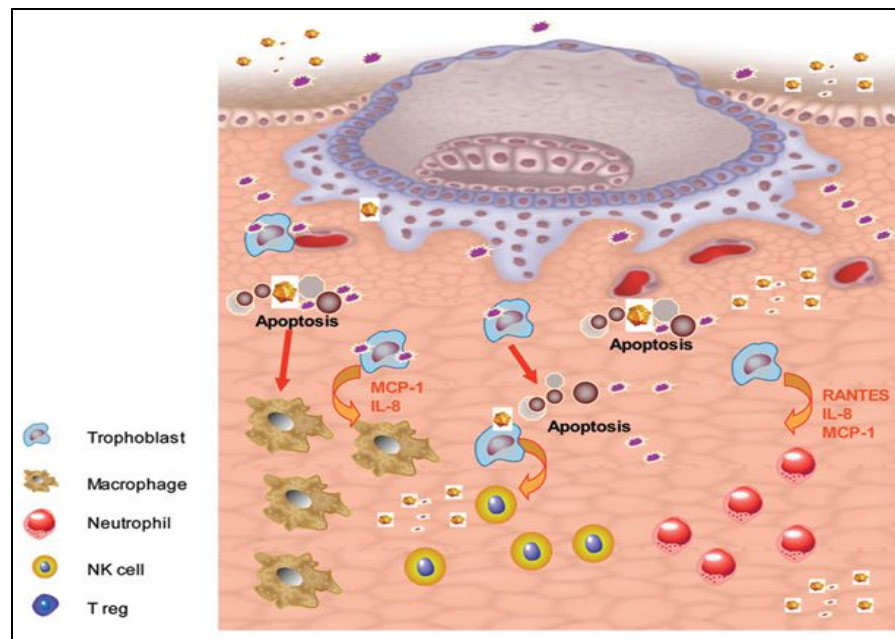


Figura 10. Interfase materno-fetal, Mor *et al*⁴⁰.

La interfase madre-feto está abierta al tráfico de células fetales a la circulación materna y otras localizaciones del sistema inmune materno. Algunas yemas de trofoblasto en la superficie del sincitiotrofoblasto pueden liberarse y entrar en la circulación materna⁴¹. De forma excepcional, el citotrofoblasto endovascular puede pasar al torrente circulatorio.

Los estudios confirman que el antígeno leucocitario humano de clase I no clásico (HLA-G) se expresa en el citotrofoblasto extraveloso. Los antígenos de

superficie clase I clásicos o II (ver apartado VIII) no son expresados por los ovocitos ni los espermatozoides. Los blastocistos expresan mRNA para HLA-G, asociados con tasas de segmentación más rápidas y protección mientras se implanta en la decidua⁴².

VII. INMUNORREGULACION DE LA GESTACION.

El embarazo es una condición inmunológica, en la que el feto actúa como un injerto semialogénico y expresa antígenos heredados del padre, los cuales al ser reconocidos como "no propios por la madre" deberían generar una respuesta inmune de rechazo. Sin embargo, en condiciones normales, este hecho no se da, y la madre no rechaza al feto⁴³.

Existe una evolución acelerada en los mecanismos que permiten que un embarazo, como mecanismo inmunogénico, llegue a término. La inmunodepresión materna se limita al sistema inmune específico, mientras que el sistema inmune innato se incrementa para garantizar una adecuada defensa de la madre frente a microorganismos patógenos. Así parece demostrarlo el incremento en la circulación materna de macrófagos a partir del segundo trimestre del embarazo⁴⁴. El éxito del embarazo se debe primordialmente a un proceso de defensa activa del feto contra la respuesta inmune de la madre.

La localización anatómica del feto es determinante para evitar los fenómenos de rechazo inmune, basándose en las siguientes consideraciones:

- ✓ La inmunización de la madre con células que expresan antígenos del padre, no afecta el desarrollo del feto ni de la placenta.
- ✓ La gestante es capaz de reconocer y rechazar a los injertos fetales cuando sean singénicos, si estos son colocados fuera del útero.
- ✓ Los linfocitos obtenidos de la decidua de pacientes abortadoras habituales proliferan cuando se les enfrenta con antígenos paternos y tienen capacidad citotóxica contra diferentes tejidos, a excepción del trofoblasto.
- ✓ La preincubación de células citotóxicas con células trofoblásticas determina una inhibición de la actividad citolítica.

Los aloanticuerpos contra el HLA fetal de origen paterno pueden aparecer en un 15% en primigestas hasta un 60% en multíparas. Estos anticuerpos están dirigidos contra antígenos de clase I y II. No tienen capacidad de producir daños al feto, ya que no se unen al sincitiotrofoblasto que no expresa antígenos del complejo de histocompatibilidad. Los anticuerpos paternos parecen ser "filtrados" por el estroma vellocitario, y la IgG es eliminada por los macrófagos con receptores Fc³⁰.

La circulación fetal y materna está separada anatómicamente, lo que implica que el feto no puede ser considerado como un trasplante. El eventual ingreso de linfocitos T de la madre a la circulación materna ocasiona la producción del TGF γ que desactiva a estos linfocitos⁴⁵. El trofoblasto expresa ligandos para las moléculas FAS presentes en algunas subpoblaciones de células TH1, que al interactuar inducen la apoptosis de estas células⁴⁶.

VII.1 CELULAR:

VII.1.1 MODIFICACIONES DE LA DECIDUA MATERNA.

La decidua es el tejido donde se produce el reconocimiento inmune de los trofoblastos. Tiene como función la protección de los tejidos maternos de la invasión trofoblástica, la nutrición del embrión y protección inmunológica del feto y de la madre.

Según estudios inmunohistológicos y citometría de flujo sobre la decidua en el primer trimestre, el 40% son linfocitos granulosa gigantes y el 22 % son macrófagos. Ambos tipos celulares son importantes en las respuestas de rechazo del injerto contra huésped⁴⁷. El citotrofoblasto extraveloso está en contacto con estas células.

Linfocitos granulosa grandes: sólo se encuentran en el útero, se originan en la medula ósea y pertenecen a la línea de las células NK. Son el grupo de linfocitos predominantes, llegando a lo máximo en la fase secretora, en el momento de la implantación. Tienen un fenotipo distinto, con una densidad superficial alta del receptor CD56. Se asocian con las moléculas HLA-Cw y HLA-G en la superficie de trofoblasto extraveloso. Aumenta su número por acción de la progesterona y la IL-15 producidas por las células del estroma. Están en íntimo contacto con los aloantígenos fetales en el espacio intervilloso, intervienen en la modificación de la vasculatura uterina y protege de microorganismos a la interfase materno-fetal.

Células Natural Killer: tienen un papel protagonista en la implantación del blastocisto. Se mantiene en gran número en el primer trimestre de la gestación y luego hay una reducción absoluta de su actividad en el tercer trimestre⁴⁸.

La inactivación de las células NK deciduales y líneas de células T es inducida por prostaglandinas. La expresión de HLA-G y E por las células del trofoblasto permiten que las NK deciduales maternas reconozcan y respondan a células fetales del trofoblasto⁴⁹.

El HLA-G ejerce sus efectos reguladores por unión a receptores específicos en diferentes tipos de células inmunes⁵⁰. El complejo receptor de leucocitos está codificado por 15 genes polimórficos en el cromosoma 19 e incluye dos familias: receptores de leucocitos tipo inmunoglobulina (ILT2, ILT4, CD85j, CD85d) y receptores de células NK tipo inmunoglobulina (receptores KIR)⁵¹. El receptor KIR2DL4 (CD158d) es un miembro de la familia KIR que también se une a HLA-G.

La inhibición de la citólisis de las NK por el HLA-G ocurre por dos vías principales:

- La **vía directa**, a través de la interacción con los receptores inhibitorios de las NK (KIR) incluyendo ILT2/LIR1, ILT4/LIR2, p49 (presente en NK deciduales), y KIR2DL4. Sin embargo las ILT2, ILT4 y p49 pueden interactuar con otras moléculas clase I⁵¹.

- La **vía indirecta**, consiste en la interacción con el receptor CD94/NKG2 del HLA-E²⁵¹ que contiene un péptido de la secuencia señal de la cadena pesada de HLA-G inhibiendo así la actividad de las NK⁵¹. El HLA-E está involucrado en la regulación positiva y negativa de la citotoxicidad de las NK⁵² (figura 11).

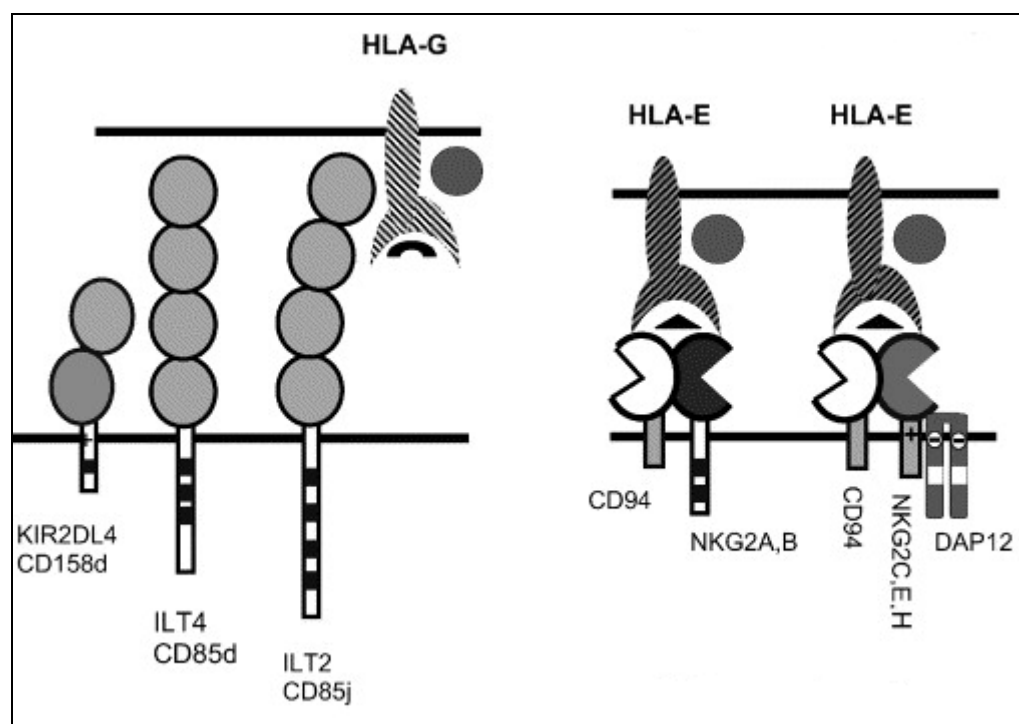


Figura 11. Receptor KIR y CD94 de las células NK, Petrie *et al*⁵³.

El reconocimiento de HLA-G por KIR/KAR y CD94 podría proveer el mecanismo por el cual las células NK controlan la migración del trofoblasto⁵³. Así, la interacción materno-fetal, y por lo tanto el futuro reproductivo podría depender de este sistema de reconocimiento inmune.

La expresión del HLA-G en células del trofoblasto disminuye la actividad de las células NK y los linfocitos T citotóxicos a través de receptores KIR⁵⁴. Los KIR

envían señales inhibitorias a las células NK uterinas y se unen a las moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad no clásicas en trofoblastos, bloqueando la citotoxicidad por NK y contribuyendo a la tolerancia inmune (Figura 12).

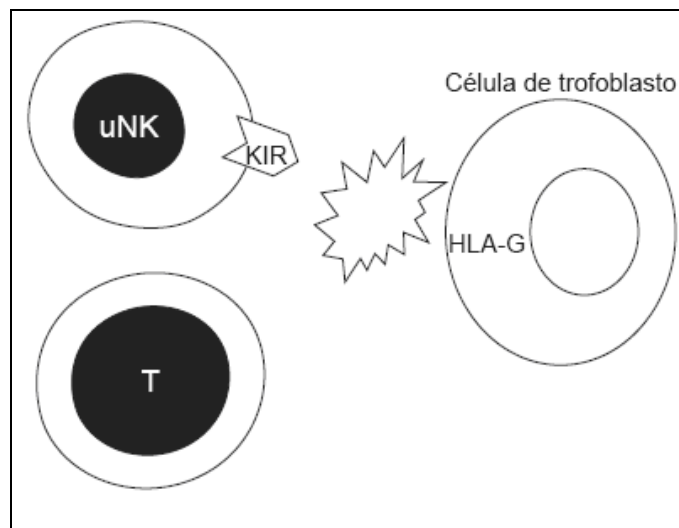


Figura 12. HLA-G (trofoblasto) y KIR (células NK), Contini *et al*⁵⁵.

Las moléculas CD336 y KIR2D modulan la actividad de las NK uterinas⁵⁶. La capacidad lítica de las NK es inhibida por el receptor KIR2D a través del HLA no clásico en el trofoblasto (Figura 13).

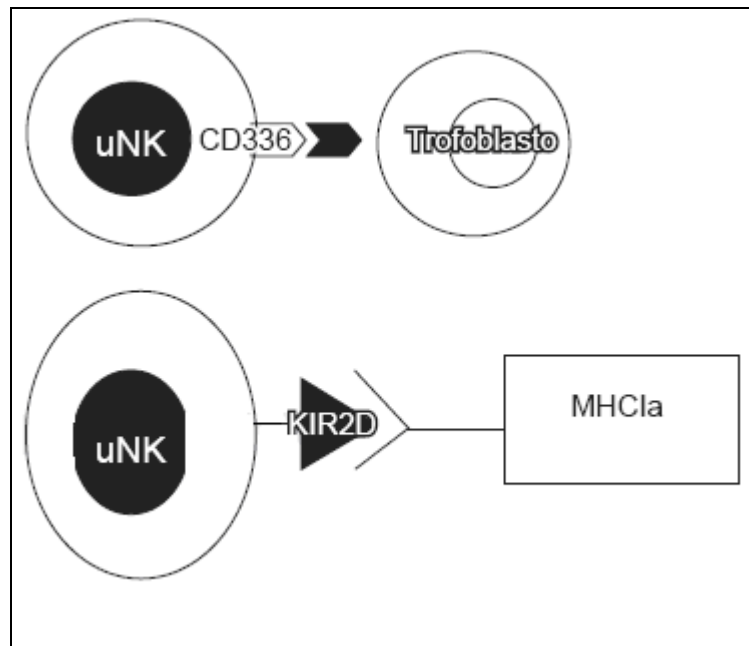


Figura 13. Interacción KIR-HLA no clásico en la interfase feto-materna, Contini *et al*⁵⁵.

Las células NK secretan el TGF- β 2 que suprime las células citotóxicas, el CSF-1 que promueve la diferenciación y crecimiento de las células del trofoblasto y el GM-CSF que tiene influencia en el crecimiento placentario y desarrollo paracrino y autocrino.

Macrófagos: la otra población celular predominante en la decidua son los macrófagos. Tienen efecto antiinflamatorio y previene la activación de los linfocitos T. Su número crece con la edad gestacional a término y representan el 15% del total de células deciduales.

Los macrófagos aumentan y se distribuyen en la decidua luego de la implantación. Los factores que contribuyen a esta quimiotaxis son: una

respuesta inflamatoria local que favorece la invasión del epitelio uterino por el blastocisto, niveles altos de hormonas esteroideas femeninas y el aumento de la concentración de péptidos (CSF-1, GM-CSF, TNF α e IL-6)⁵⁷. El IFN γ producido por las NK incrementa la expresión de genes HLA clase I en los macrófagos y esto podría influenciar el repertorio de péptidos presentados durante la embriogénesis e implantación.

Células T: los grupos de células linfoides grandes en los ganglios linfáticos son centros de reactividad inmune donde las células T y NK se activan. Se encuentran cerca de las glándulas endometriales y son activadas en el primer trimestre como resultado del estímulo antigénico fetal ⁵⁸.

En la Figura 14, observamos que las células dendríticas tolerogénicas capturan y procesan antígenos procedentes de las células trofoblásticas en un microambiente antiinflamatorio. Estas migran a los ganglios linfáticos que drenan el útero y presentan el antígeno a los linfocitos T vírgenes diferenciándose a linfocitos T reguladores y promueven su expansión y activación. Son reclutados por el trofoblasto al sitio de implantación por medio de citoquinas, y van a suprimir la respuesta de los linfocitos efectores o inducen su apoptosis, para un perfil tolerogénico.

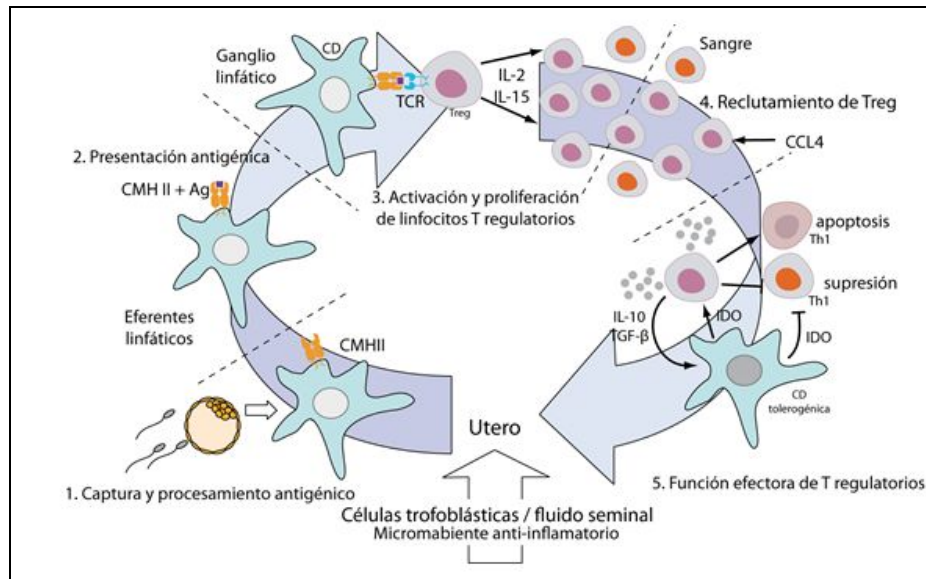


Figura 14. Microambiente anti-inflamatorio /tolerogénico de linfocitos T, Grasso *et al* ⁵⁹.

Las células T maternas reconocen antígenos fetales y esta respuesta origina proliferación y acumulación de más linfocitos T. Durante el embarazo, los antígenos paternos inducen anticuerpos HLA específicos en la madre, elevando los precursores de células T citotóxicas para la inmunotolerancia fetal⁹².

Los péptidos del HLA-G se unen como moléculas de adhesión a células T supresoras CD8+ que han migrado a la decidua durante el período de implantación del blastocisto. De esta manera el trofoblasto podría seleccionar las células supresoras que interaccionan con el huésped materno⁹².

La proporción de linfocitos T varía según avanza la gestación. En el primer trimestre, los linfocitos T disminuyen y la relación CD4/CD8 se reduce. Aunque

el estado de inmunosupresión materna se mantiene, una respuesta dinámica de gran número de clones de células T es detectada a las 10 semanas de gestación y alcanzan su máxima concentración durante el segundo trimestre. Después de la semana 30, todos los clones de células T desaparecen antes del parto y el grado de clonalidad alcanza niveles normales.

VII.1.2 AMBIENTE TH2 EN LA INTERFASE MATERNO-FETAL.

En el embarazo se produce una modificación de la respuesta inmune, ya que se pasa de una respuesta TH1 a una TH2, por cambio en el equilibrio de las citoquinas por la placenta⁶⁰. La IL-4 se produce en el sincitiotrofoblasto y macrófagos deciduales, y la IL-10 es secretada por el citotrofoblasto positivo para HLA-G.

Las células TH1 inducen varias acciones citotóxicas e inflamatorias mediadas por la acción de IL-2, IL-12, INF γ y TNF α , que estimulan las células T citotóxicas y las NK⁶¹. Son responsables de la reacción inflamatoria de la inmunidad celular, la hipersensibilidad retardada y la lesión tisular en caso de las enfermedades infecciosas y autoinmunes.

Las células TH2 producen IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, que estimula la producción de IgG por las células B, y se asocia a una respuesta de tipo humoral, favoreciendo la aparición de anticuerpos⁶².

Estos dos sistemas interactúan, cuando el INF γ producido por TH1 inhibe el desarrollo de células B, mientras que las TH2 producen IL-10 e IL-4 que inhibe la síntesis de citoquinas por TH1. El HLA-G inhibe la proliferación de CD4 y disminuye la producción de INF γ y TNF α por las células deciduales, además que aumenta la IL-10 y cambia el fenotipo TH1 a TH2 tolerogénico⁶³. En condiciones normales están en equilibrio, pero una desviación en el patrón de citoquinas, como ocurre con la producción placentaria, lleva al predominio de un tipo de respuesta sobre otro (Figura 15).

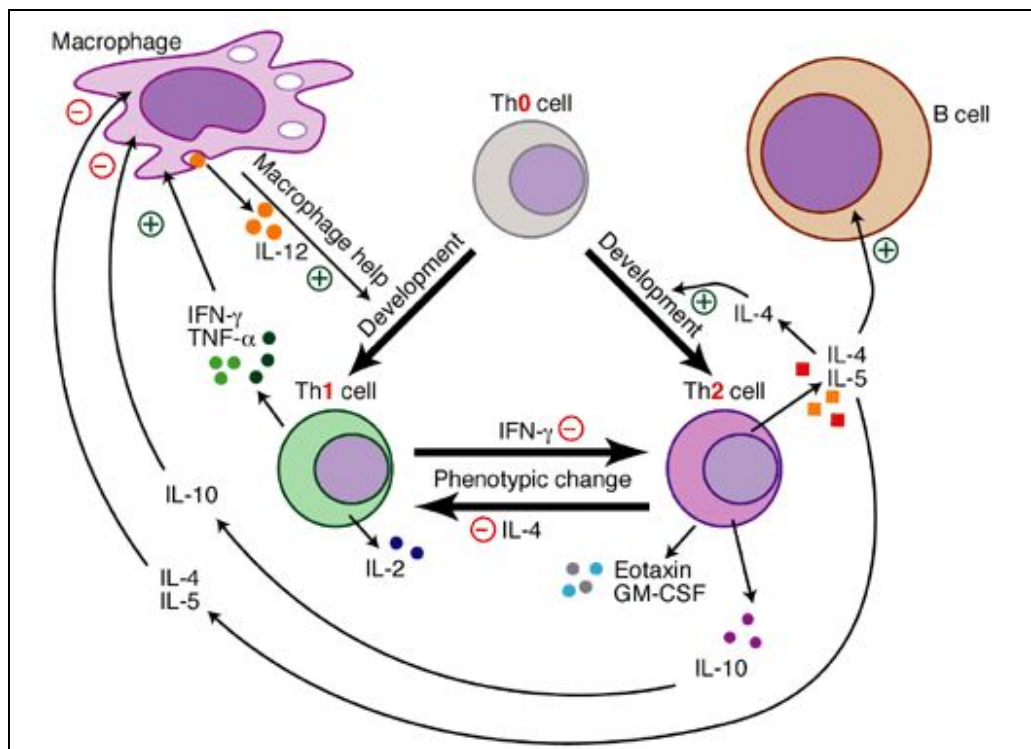


Figura 15. Interacciones entre TH1 y TH2, Grasso et al ⁵⁹.

Una prevalencia en la respuesta TH1 sobre la TH2 se asocia con fallos en la implantación, menor resistencia a la infección y menor producción de INF γ . Tiene acción citotóxica directa sobre el embrión, lesionando a las células trofoblásticas. Tanto el TNF α como el INF γ produce inhibición del crecimiento trofoblástico in vitro. Sin embargo, las citoquinas asociadas a una respuesta TH2 contribuyen a la implantación del embrión, desarrollo de la placenta y supervivencia del feto hasta el término de la gestación⁶⁴.

La producción de citoquinas para una respuesta TH2 en la interfase materno fetal depende de los linfocitos CD4+, los macrófagos en el trofoblasto veloso, las células NK y las células estromales⁶⁵. Hacia el final del tercer trimestre, en relación con el parto, existe una respuesta predominantemente TH1, por lo que muchos autores hablan de mecanismos inmunológicos implicados en los mecanismos del inicio del parto⁶⁶.

VII.2 HUMORAL

IL-10: potente antiinflamatorio producido por los linfocitos granulares gigantes y por el trofoblasto. Disminuye la producción de citoquinas y quimiotaxis de los linfocitos TH1 y macrófagos, interfiere en la presentación de los antígenos, inhibe la respuesta de los CD8+ y las NK, actúa como mediador de otros reguladores uterinos (progesterona, catecolaminas y prostaglandinas inducen su expresión), y activa la producción de HLA-G⁶⁷.

IL-4: potente inhibidor de los linfocitos TH1 al inhibir la producción de INF γ y de IL-12⁶⁸. Estimula la producción de progesterona en el cuerpo lúteo. Su receptor se localiza a nivel del citotrofoblasto y las vellosidades coriales.

IL-6 e IL-13: ambas son citoquinas de las respuestas TH2. Una vez implantado el blastocisto se segrega IL-6 para inhibir la respuesta inflamatoria del endometrio y activar la producción de progesterona por el cuerpo lúteo.

INF γ : es una citoquina típica de la respuesta celular, por los linfocitos TH1.

TNF α : durante el embarazo hay linfocitos productores de TNF α en la placenta y su aumento se ha relacionado con abortos y necrosis placentarias infectadas por patógenos⁶⁹. Sus acciones proinflamatorias son la quimiotaxis de macrófagos y el desarrollo de la respuesta TH1. En el endometrio del embarazo temprano se ha detectado la expresión del MIF que inhibe la histólisis mediada por NK, activa la fagocitosis de los macrófagos y la producción de TNF α e IL-1.

Prostaglandina E2: se produce en la decidua y contribuye al mantenimiento de la respuesta linfocitaria TH2, aumenta la producción de IL-10 de los macrófagos, inhibe la IL-12 y ayuda a la ausencia de rechazo inmune⁷⁰.

VII.3 HORMONAL

El estradiol y la progesterona estimulan la producción de citoquinas TH2 por los monocitos y la PAPP-A que inhibe la proliferación de las células T y la secreción de IL-2. Ayudan a la tolerancia materna al promover la respuesta TH2 sobre TH1.

El LIF es sintetizado y secretado por el endometrio materno. Es necesario para la implantación, diferenciación y crecimiento del trofoblasto⁷¹. Entre las sustancias que activan al LIF se encuentran la progesterona, la IL-4 y la IL-1, mientras que es inhibida por el INF γ y la IL-12.

La progesterona es necesaria para el mantenimiento del embarazo. Su producción en el cuerpo lúteo es estimulada por la IL-6 y IL-4⁷². En el sincitiotrofoblasto, la progesterona favorece la producción de citoquinas TH2. Inhibe la fagocitosis y la proliferación de linfocitos T CD4+ inducidas por IL-1, y funciona en sinergia con la prostaglandina E. El estradiol tiene un efecto dual dependiente de la concentración, mientras que la progesterona y la testosterona favorecen la expansión de las células TH2 (Figura 16).

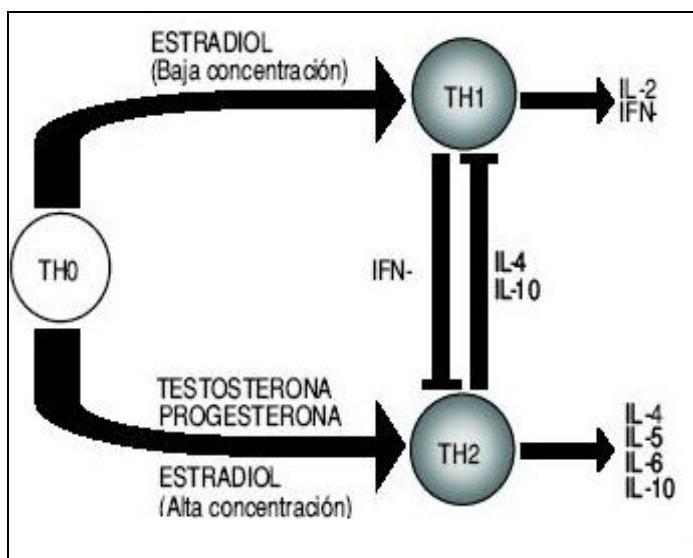


Figura 19. Acción hormonal en la respuesta inmune, Yie *et al* ⁷².

La apoptosis o muerte celular programada se ha propuesto como mecanismo de defensa del trofoblasto frente al sistema inmune. Este mecanismo puede ponerse en marcha por las citoquinas propias de las respuestas TH1, el $\text{TNF}\alpha$, o la expresión de FAS ligando en la membrana celular.

El FAS ligando (CD95L) es un péptido de membrana que se expresa en el citotrofoblasto, sincitiotrofoblasto y decidua y se une al receptor FAS. Es la molécula efectora más importante de los linfocitos citotóxicos, y está implicada en la tolerancia inmune como en el suicidio de células T estimuladas por un antígeno⁷³.

Cuando los linfocitos expresan FAS se unen al FAS-L, provoca el acoplamiento de la proteína FADD y se pone en marcha la cascada de las caspasas en la célula activada, terminando en muerte celular y protegiendo el ataque inmune

por las células T. Los linfocitos apoptóticos son rápidamente eliminados por los fagocitos y no inducen inflamación. El resultado de la apoptosis de los linfocitos T activados por un antígeno fetal es que se pierden células específicas contra él induciendo tolerancia. El HLA-G soluble es capaz de inducir la apoptosis de las células T CD8 a través de la vía FAS/FASL (Figura 17).

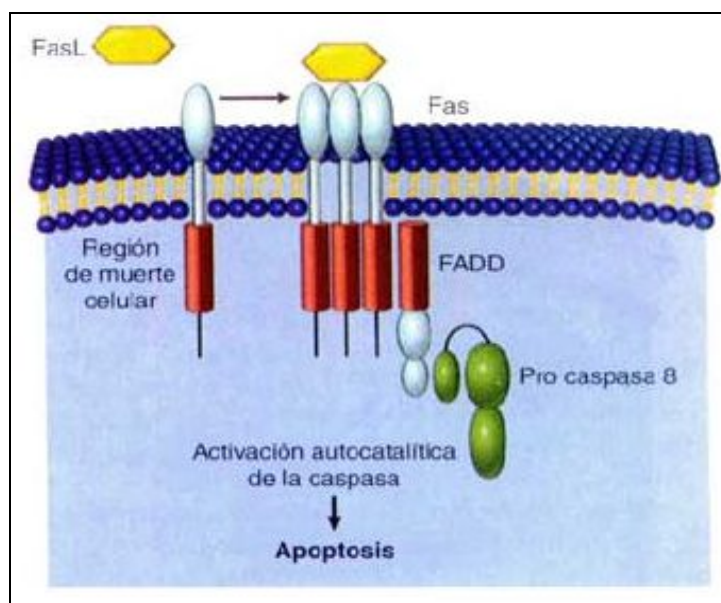


Figura 17. Sistema FAS y FAS ligando, Litman *et al*⁸.

La disminución de la actividad del complemento es otro de los principales efectores de la inmunidad humoral, así como mecanismo importante en la inmunidad innata⁷⁴. Se activa por tres vías, la clásica (unión de C1 al complejo antígeno-anticuerpo), la alternativa (C3b se une directamente a superficies antigénicas) y la de las lectinas. El trofoblasto expresa reguladores del sistema de complemento para que la gestación tenga éxito. La activación incontrolada del complemento induce el aborto.

VIII. COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD.

Las moléculas de histocompatibilidad fueron descubiertas por ser las principales responsables de las reacciones de rechazo de tejidos trasplantados entre individuos de la misma especie⁷⁵. Los loci genéticos reguladores de la síntesis de estos antígenos se agrupan en una región denominada *Complejo Principal de Histocompatibilidad* y se heredan de acuerdo con las leyes de Mendel.

Las moléculas de histocompatibilidad se localizan en la superficie de las células de las distintas especies animales. En el ser humano se denominan antígenos HLA (antígenos leucocitarios humanos, del inglés "*Human leukocyte antigen*") y están codificadas por genes ubicados en el brazo corto del cromosoma 6 (Figura 18).

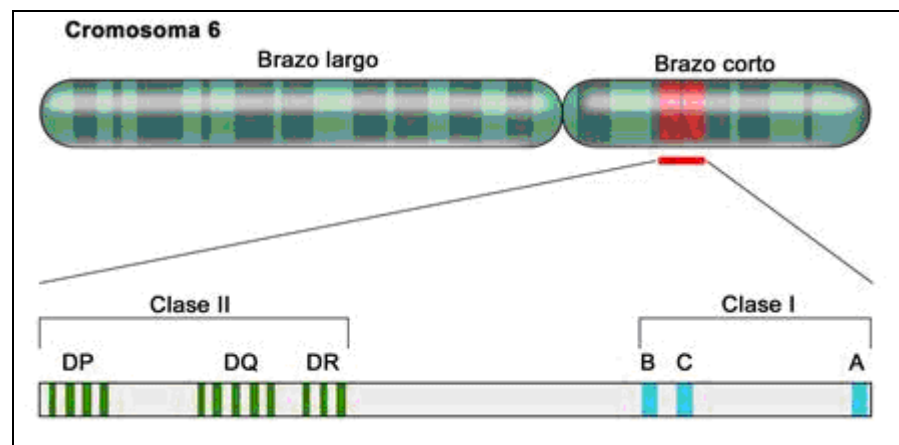


Figura 18. HLA en el cromosoma 6 ⁷⁶.

Los genes del *Complejo Principal de Histocompatibilidad* desempeñan un papel central en la respuesta inmunitaria frente a antígenos proteicos, ya que los linfocitos T específicos para un antígeno no lo reconocen en su forma libre ni soluble, sino que reconocen porciones de los antígenos proteicos, unidos de forma no covalente a productos génicos del HLA⁷⁷.

VIII. 1 TIPOS DE MOLECULAS HLA:

Los genes del Complejo Principal de Histocompatibilidad en el hombre son muy polimórficos, es decir, existen muchas variantes alélicas en una población que difieren en sus distintas capacidades para unirse y presentar los diferentes determinantes antigénicos de las proteínas⁷⁸. Según su estructura, las moléculas de histocompatibilidad se dividen en dos grandes grupos: **moléculas de clase I** y **moléculas de clase II**, que se encuentran codificadas por regiones distintas dentro de la región genética del HLA y desempeñan diferentes funciones inmunológicas.

Un haplotipo HLA es una región genética de un cromosoma que contiene todos los genes HLA (excepto los que codifican la $\beta 2$ microglobulina). Incluye los genes clase I "clásicos" o clase Ia: HLA-A, HLA-B y HLA-C; los genes clase I no clásicos o Ib: HLA-E, HLA-F y HLA-G, y los genes clase II: HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP²⁴³. Su herencia es codominante, por lo que el gen del padre y de la madre se expresa en el fenotipo del hijo, y se expresan los dos alelos de cada locus⁷⁹.

El gen HLA-G está localizado en el cromosoma 6, cerca del HLA-A. El HLA-E está localizado entre el HLA-C y el HLA-A, mientras que el HLA-F está situado cerca del HLA-G y el HLA-A. La estructura de los genes HLA de clase Ib es muy similar a los genes de clase Ia. Sin embargo, existen diferencias en relación con el extremo 3'- (cola citoplasmática). La cola citoplasmática corta del HLA-G es importante para disminuir la endocitosis de la misma (Figura 19).

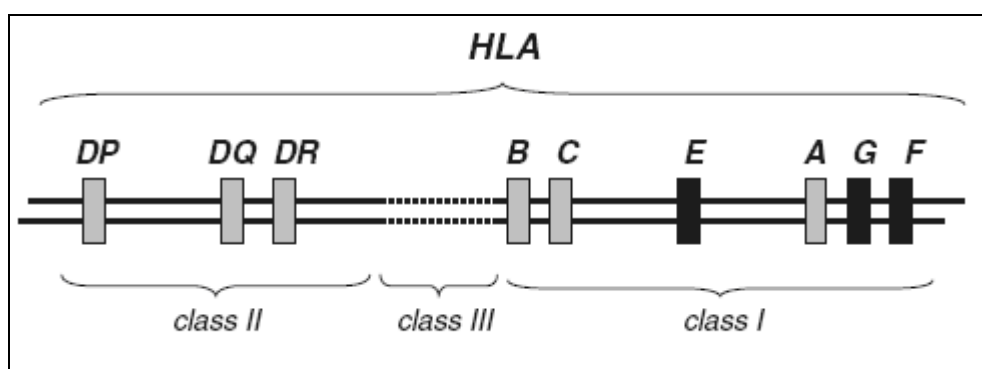


Figura 19. Genes HLA clase I, II y III, Brand *et al*⁸⁰.

VIII. 1.1 MOLÉCULA HLA CLASE I. PROTEÍNAS Y GENES.

Las moléculas de los *antígenos de histocompatibilidad de clase I* están constituidas por 2 cadenas polipeptídicas: una cadena pesada, glicosilada, de mayor tamaño, con un peso molecular de 45 kD, asociada, mediante interacciones no covalentes a una cadena ligera, la $\beta 2$ *microglobulina* con un peso molecular de 12.5 Kd⁸¹ (Figura 20).

La $\beta 2$ *microglobulina* es idéntica en todos los individuos de la misma especie, y los genes que la codifican no se encuentran en el Complejo Principal de Histocompatibilidad. Su análisis estructural revela que pertenece a la

superfamilia de las inmunoglobulinas, con una notoria homología con el tercer dominio constante de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas⁸³.

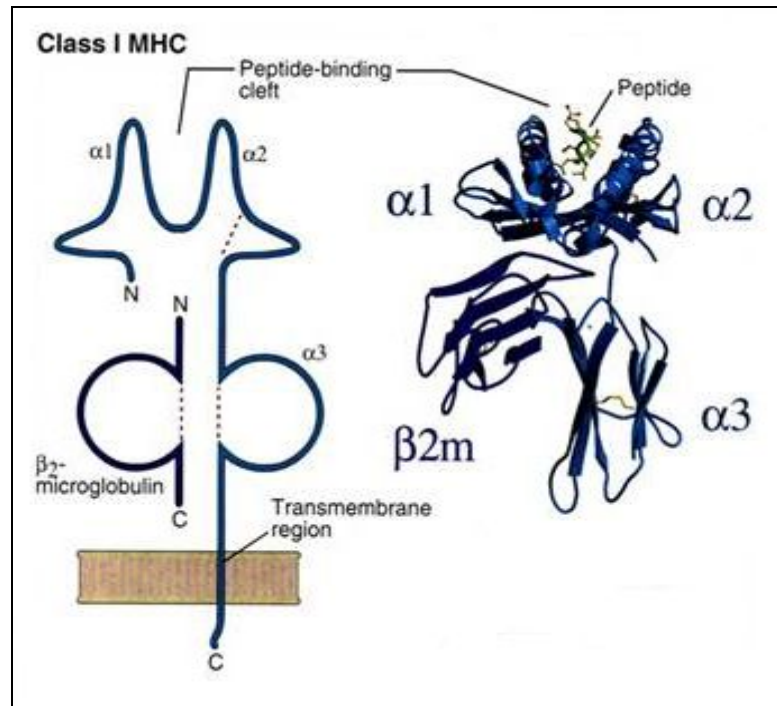


Figura 20. Molécula HLA clase I ⁸².

La cadena pesada, por el contrario, es altamente variable entre individuos de la misma especie, siendo responsable del polimorfismo antigénico de las moléculas de histocompatibilidad clase I. Se distinguen 3 zonas bien definidas: una zona extracelular de mayor tamaño en la que se encuentran los determinantes antigénicos de la molécula, una pequeña región transmembrana, hidrófoba, y finalmente una región intracitoplasmática de 35 aminoácidos.

La zona extracelular se halla organizada en tres dominios de 90 residuos cada uno, denominados α1, α2 y α3, mantenidos por la existencia de puentes

disulfuro intracatenarios. Los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ constituyen regiones de contenido variable de aminoácidos, es decir, son zonas donde radica la variabilidad de la molécula. El dominio $\alpha 3$ es constante, pertenece a la familia de las inmunoglobulinas y tiene notable homología con la región constante de la $\beta 2$ microglobulina (Figura 21).

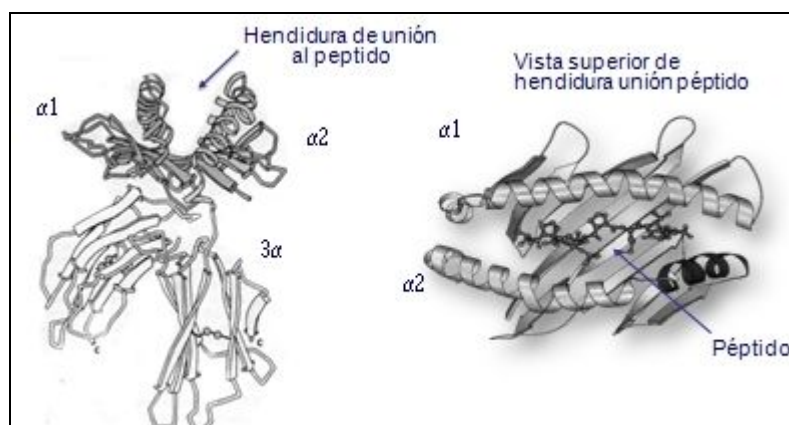


Figura 21. Estructura tridimensional HLA clase I, Torres *et al*⁸⁵.

La región que codifica las moléculas de clase I está dividida en 3 loci conocidos como A, B y C, que codifican 3 tipos de cadenas pesadas para las distintas moléculas de clase I (HLA-A, HLA-B y HLA-Cw). Son los genes clase I "clásicos" o Ia. Codifican para glicoproteínas de membrana y están implicadas en la restricción del reconocimiento antigénico mediada por linfocitos T citotóxicos.

Las moléculas HLA de clase I se expresan en la mayoría de las células nucleadas del organismo⁸⁶. En algunas localizaciones, su expresión es mínima

o nula, como en las células musculares, neuronas del SNC y fibroblastos. El $\text{INF}\alpha$, $\text{INF}\beta$ e $\text{INF}\gamma$ aumenta la expresión del HLA tipo I. Existen genes de HLA clase I "no clásicos" o Ib, que son el HLA-E, HLA-F y el HLA-G, que se explicará más adelante.

VIII. 1.2 MOLÉCULA HLA CLASE II. PROTEÍNAS Y GENES.

Las moléculas de clase II son glicoproteínas que se encuentran en la superficie celular. Están formadas por 2 cadenas, denominadas cadena alfa o pesada y cadena beta o ligera, asociadas entre sí mediante interacciones de naturaleza no covalente⁸⁷. Tanto la cadena ligera como la pesada se encuentran codificadas por genes situados en el Complejo Principal de Histocompatibilidad.

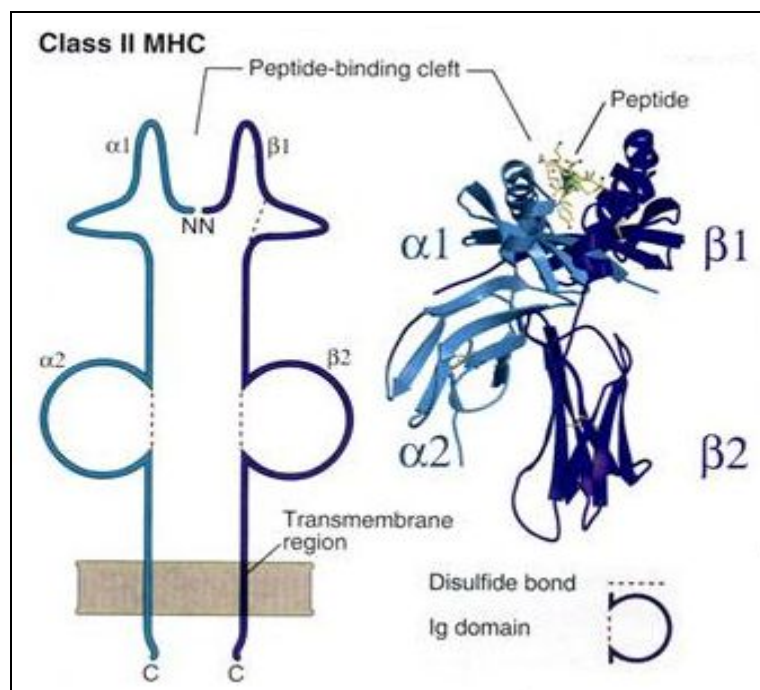


Figura 22. Molécula HLA clase II ⁸².

La cadena pesada tiene un peso molecular de 33 kD y la cadena ligera, 29 kD. Ambas tienen una organización semejante. Están constituidas por 2 dominios extracelulares $\alpha 1$ y $\alpha 2$ en la cadena pesada, y $\beta 1$ y $\beta 2$ en la cadena ligera. El dominio $\alpha 1$ es abierto, mientras que los dominios $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$ se pliegan mediante un puente disulfuro en cada uno de ellos.

Los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$ pertenecen a la familia de las inmunoglobulinas, mientras que los $\alpha 1$ y $\beta 1$, que son los que presentan mayor diversidad, presentan homología con los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de los antígenos clase I. Un tercer dominio corresponde a la región de cada cadena que atraviesa la membrana celular, contiene unos 3 aminoácidos y es hidrofóbica. El cuarto dominio corresponde a la parte citoplasmática de la molécula, es hidrofílica y tiene 16 aminoácidos.

En las moléculas clase II se encuentran los pares de genes que codifican las cadenas α y β de los antígenos HLA-DR, HLA-DQ²⁴⁴ y HLA-DP (Figura 23).

Las moléculas de HLA de clase II se expresan en la estirpe monocito-macrófagos, linfocitos B activados, linfocitos T CD4⁺ activados y el endotelio vascular. También se expresa en alta densidad, en células que actúan como presentadoras de antígenos, como las dendríticas del bazo, las epidérmicas de Langerhans y el endotelio. El INF γ aumenta la expresividad de HLA clase II en células que ya lo tienen (excepto linfocitos B) y células que no lo tenían previamente.

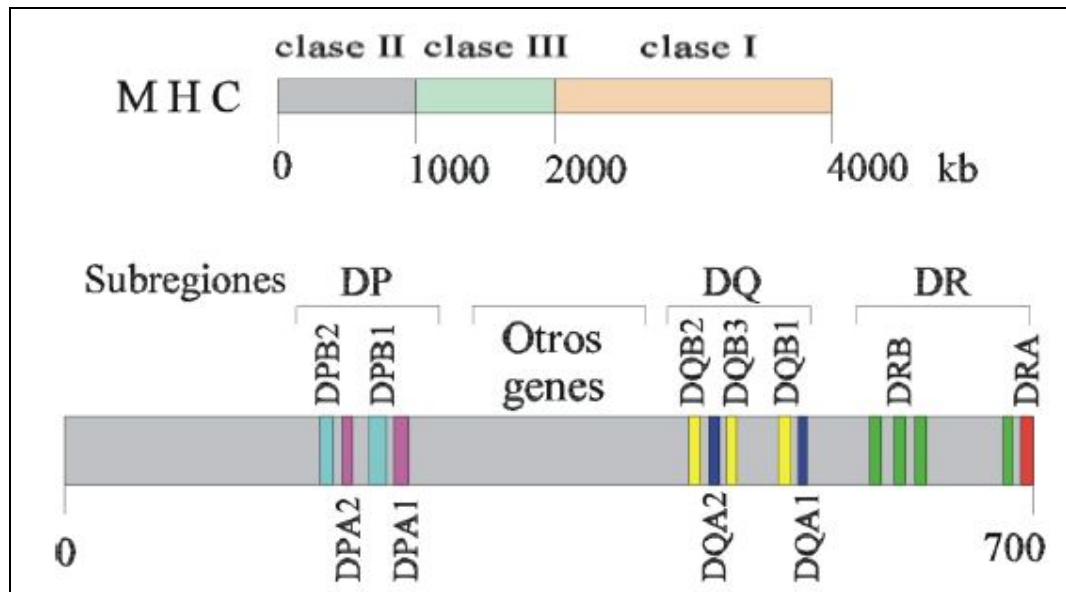


Figura 23. Estructura de las subregiones DP, DQ y DR, Geraghty *et al* ⁸⁸.

VIII. 2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL SISTEMA HLA.

Las moléculas del HLA están asociadas a membranas y no se secretan, es decir, las células T solo interactúan con células que expresan antígenos asociados al complejo mayor de histocompatibilidad y no con antígenos solubles. Las células que llevan moléculas del HLA presentan el antígeno a los linfocitos T.

Los patrones de asociación del antígeno a las moléculas clase I o II del HLA determinan el tipo de célula T que es estimulada por las diferentes formas de los antígenos. Es decir, los fragmentos peptídicos exógenos se unen a las moléculas de clase II, y los péptidos generados en el citosol, es decir, endógenos, se asocian a moléculas de clase I.

Las características generales del sistema HLA son: el polimorfismo, el desequilibrio de ligamento, la reacción cruzada y la restricción de la localización tisular.

VIII. 2.1 POLIMORFISMO:

Es el resultado de la presión evolutiva ejercida por agentes infecciosos debido a mutaciones puntuales y la recombinación genética. El HLA posee diferentes loci y un número extraordinariamente grande de alelos diferentes en cada uno de ellos. Por lo tanto, es el complejo más poligénico y polimórfico que se conoce⁸⁹. Se han descrito más de 1000 alelos para HLA clase I y más de 500 para clase II. Este enorme polimorfismo y la codominancia de alelos dan como resultado una gran diversidad de moléculas dentro de una especie (Figura 24).

Los genes responsables de la aceptación o el rechazo de un tejido son los genes de histocompatibilidad, y esas diferencias se atribuyen al *polimorfismo genético* entre los diferentes alelos de histocompatibilidad⁹¹. La genética del rechazo del trasplante indica, que el producto de los genes del HLA se expresa de forma codominante, es decir, se expresan los alelos de los dos cromosomas de una pareja (Figura 24).

Las proteínas HLA-G son casi monomórficas, es decir, con cuatro polimorfismos de aminoácidos descritos. Está en contraste con los antígenos de clase I y II, que son muy pleomórficos.

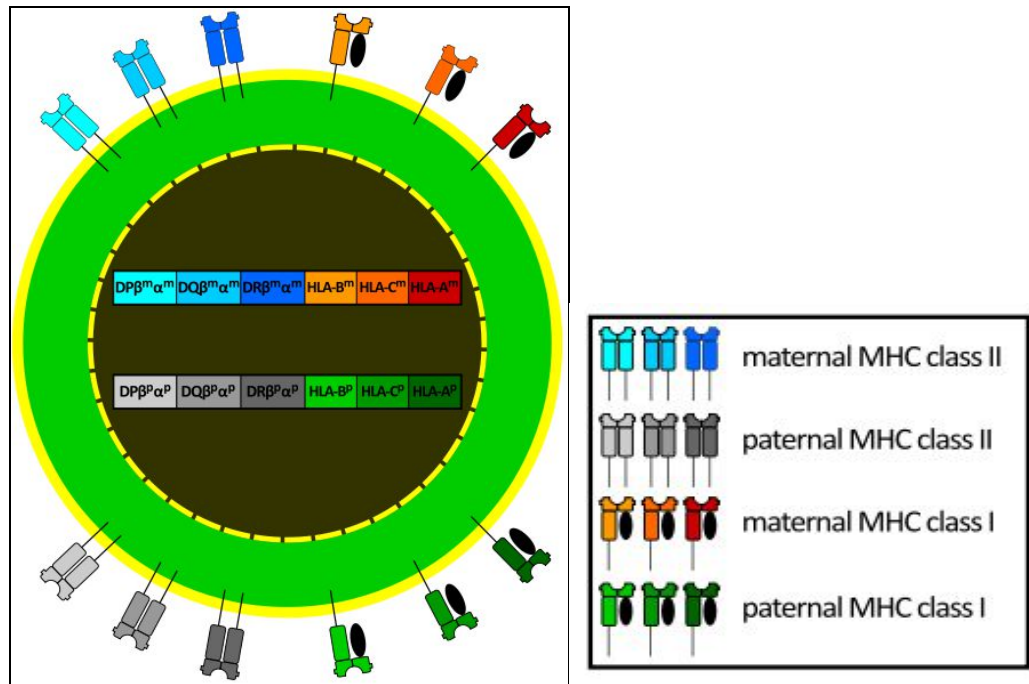


Figura 24. Expresión de HLA clase I y II materno y paterno, Tan *et al*⁹⁰.

Este pleomorfismo de la molécula es debido a una adaptación evolutiva⁹², dado que el papel del HLA es presentar todo tipo de péptido procedente de organismos invasores. Estos polimorfismos están restringidos a la zona de unión del péptido y supone diferencias mínimas entre la secuencia de aminoácidos, siendo suficientes para originar una diferencia en la estructura tridimensional de la hendidura de anclaje de los péptidos. Los polimorfismos moleculares se encuentran en los exones 2 y 3 para HLA-I y en el exón 2 para el HLA-II.

Cada célula humana expresa 6 alelos HLA de clase Ia (los alelos HLA-A, B y C de cada progenitor) y 6-8 alelos HLA de clase II (HLA-DP y DQ, uno o dos HLA-DR de cada progenitor y combinaciones de ellos)⁹³. El polimorfismo de

estos genes es muy elevado: existen 350 alelos de HLA-A, 620 alelos del B, 400 alelos de DR y 90 alelos de DQ⁹⁴. Como estos alelos se heredan y expresan en muchas combinaciones diferentes, cada individuo expresará moléculas diferentes a otro individuo, excepto en los gemelos idénticos.

El gen HLA-G también tiene polimorfismos en los intrones, la región promotora y la región no traducida (3'UTR). Este último consiste en la delección/inserción de 14 pares de bases (bp) y se asocia con niveles reducidos de expresión de ARNm de HLA-G ⁹⁵. El polimorfismo de 14-bp situado en el exón 8 ha atraído la atención debido a su papel en el splicing alternativo y la estabilidad del ARN.

El sistema inmune ha ido mutando los genes del HLA para generar una alta variabilidad en el sitio de unión al péptido, de manera que anula la posibilidad de que los microorganismos generen variantes cuyos péptidos no son presentados por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad. Esta presión de selección hace que la frecuencia de modificaciones de secuencias en diferentes alelos sea muy superior a lo esperado si el proceso fuera simples mutaciones al azar. La recombinación entre alelos del mismo locus es el mecanismo más utilizado para crear polimorfismos genéticos.

La distribución de los alelos HLA-G es diferente en las poblaciones étnicas. Las poblaciones caucásicas muestran un polimorfismo muy limitado. En contraste con esto, los afroamericanos muestran un alto polimorfismo. Esto es importante en el estudio genético de las poblaciones.

La ventaja de tener múltiples genes del HLA clase I y II es que aportan diferentes especificidades de unión a péptidos y mejora la potencia de la respuesta inmune contra el patógeno al aumentar el número de linfocitos T específicos.

El paludismo representa un ejemplo de este fenómeno de distribución selectiva de un determinado alelo que confiere ventajas evolutivas. Es una enfermedad endémica y mortal en África, pero en la región oeste del continente, los individuos con el HLA-B52 (molécula clase I), tienen una alta resistencia y una baja proporción de enfermedad con cuadros leves⁹⁷. Es una selección positiva HLA que les confiere una clara ventaja evolutiva en las regiones donde el paludismo es endémico.

Las desventajas del polimorfismo HLA son: mayor incidencia de enfermedades autoinmunes por falta de autocontrol tímico, los inconvenientes en los trasplantes de órgano sólido y de médula ósea por incompatibilidad donante-receptor⁹⁸ y la dificultad en el diseño de vacunas de tipo celular. Los pacientes que rechazan trasplantes o tienen reacciones transfusionales frente a leucocitos, desarrollan anticuerpos circulantes contra antígenos de los leucocitos de la sangre o del órgano del donante. Esos aloantígenos son productos de genes polimórficos que distinguen los tejidos extraños de los propios. Existen varios loci genéticos polimórficos agrupados juntos en una sola área del genoma, que ayudan a predecir la intensidad del rechazo del injerto⁹⁹.

VIII. 2.2 DESEQUILIBRIO DE LIGAMENTO:

A pesar de los principios de la genética de Mendel que establece que la frecuencia de alelos de un locus no afecta la frecuencia de alelos de otro locus, el HLA no sigue esta regla básica. La frecuencia de la presencia de determinados alelos en distintos loci al mismo tiempo es mucho mayor o menor a lo esperado de la población general. Es lo que se llama *desequilibrio de ligamento*. Es posible que una combinación de alelos pueda ser ventajosa en términos inmunológicos y se seleccione positivamente.

Representa la tendencia de ciertos alelos a asociarse entre sí, formando haplotipos más frecuentes que lo previsto por asociación aleatoria. Por ejemplo, la frecuencia del haplotipo HLA-A1, B8, DR3 y DQ2 en la población caucásica es mucho mayor que la esperada por la recombinación aleatoria de los 3 alelos.

VIII.2.3 REACCION CRUZADA:

Fenómeno por el que un anticuerpo reacciona con varios antígenos diferentes. Muchas moléculas de HLA comparten una gran homología de secuencia de aminoácidos en la estructura molecular, y no es extraño que dichas moléculas o antígenos HLA compartan un sitio de unión a un anticuerpo específico.¹⁰⁰ Estos grupos de antígenos HLA, que comparten los sitios de unión de los anticuerpos, se denominan "*cross reacting groups*", y puede suponer una limitación de las técnicas inmunológicas.

VIII.2.4. RESTRICCIÓN DE LA LOCALIZACIÓN TISULAR:

Las moléculas HLA clase I y II corresponden a dos vías diferentes de procesamiento de antígenos y de defensa inmune (Tabla 1).

La expresión del gen HLA es restrictivo a nivel celular. La proteína HLA clase I se ha descrito en todas las células nucleadas excepto en glóbulos rojos, células germinales y sincitiotrofoblasto. Las neuronas, los hepatocitos y los monocitos presentan niveles bajos de moléculas HLA clase I.

Característica	HLA-II	HLA-I
Péptido-HLA	Cadenas polimórficas α y β , péptido unido a ambas	Cadenas polimórficas α y β 2 microglobulina, péptido unido a cadena α
Células presentadoras de antígenos	Dendríticas, mononucleares, linfocitos B, timo	Casi todas las células nucleadas
Función de linfocitos T	CD4+	CD8+
Origen de proteínas antigénicas	Endosomas o lisosomas	Citosol (fagosomas)
Enzimas	Proteasas	Proteasoma citosólico
Sitio de carga	Compartimiento vesicular	Retículo endoplasmático
Moléculas de transporte	Cadena invariante, DM	TAP

Tabla 1. Características del HLA clase I y II ¹⁰¹.

La proteína HLA clase II se expresa en trofoblasto, timo del adulto, córnea, islotes pancreáticos y precursores eritroides. Puede ser inducida en situaciones

como trasplantes¹⁰², enfermedades inflamatorias¹⁰³, células tumorales¹⁰⁴ e infecciones virales¹⁰⁵.

La molécula de HLA-G se expresa en la superficie celular de las presentadoras de antígeno (macrófagos, dendríticas y linfocitos B) que presentan péptidos antigénicos extracelulares procesados a los linfocitos T cooperadores (CD4+).

Los linfocitos T presentan una propiedad llamada **restricción HLA**: sólo pueden detectar un antígeno si viene presentado por una molécula HLA del mismo individuo. Esto se debe a que cada linfocito T tiene una especificidad dual: el receptor del linfocito T reconoce algunos residuos del péptido y simultáneamente algunos residuos de la molécula HLA que lo presenta. Esto es importante en los trasplantes, ya que los linfocitos T deben aprender a reconocer las moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad propias del individuo en su maduración y selección en el timo.

VIII.3 FUNCIONES DEL SISTEMA HLA.

Las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad presentes en las células del organismo son marcadores para las células inmunes de lo “no propio” e intervienen en la educación tímica de los linfocitos T. Los linfocitos T que reconocen moléculas clase I pertenecen a la población citotóxica, y los que reconocen moléculas HLA clase II tienen función reguladora produciendo citoquinas. Estas moléculas son antigénicas para otro individuo de la misma especie y por lo tanto activan el sistema inmune de rechazo¹⁰⁶.

VIII.3.1 PRESENTACION ANTIGÉNICA DE LAS MOLECULAS HLA I.

Las moléculas HLA de clase I actúan como receptores de péptidos endógenos, propios y alterados (tumores y virales), para hacerlos accesibles a la detección por las células T CD8+. Cada molécula HLA clase I puede formar complejos con un amplio espectro de péptidos, pero existe selectividad alelo-específica. Las proteínas intracelulares son degradadas en un proteasoma ATP dependiente. Los péptidos generados en el citosol son trasladados al retículo endoplasmático por los transportadores TAP1 y TAP2, dependiente de ATP. Se ensambla la cadena pesada asociada a la calreticulina y la tapasina, y este complejo se carga con la molécula de clase I, adquiere conformación madura, se libera y transporta a la membrana celular a través de la ruta secretora de Golgi (Figura 25).

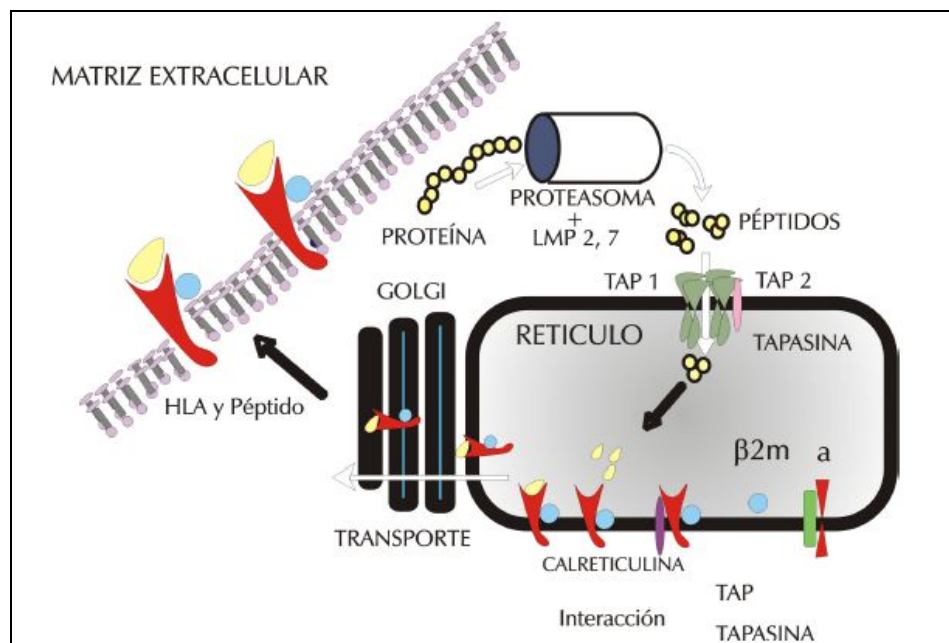


Figura 25. Presentación antigénica para HLA clase I,
Gómez-Casado *et al* ¹⁰⁷.

VIII.3.2 PRESENTACION ANTIGENICA DE LAS MOLECULAS HLA II.

Las moléculas de clase II unen un grupo heterogéneo de péptidos procedentes del exterior celular y se encargan de exponerlos en la superficie de las células presentadoras de antígeno (linfocitos B, células dendríticas y macrófagos) de los linfocitos T CD4+. La mayor parte de los péptidos provienen de la degradación endocítica de proteínas exógenas o proteínas endógenas que acceden a los endosomas. El ensamblaje de la molécula clase II con el péptido ocurre en los compartimientos MIIC (MHC class II compartment). Las cadenas α y β del HLA clase II se sintetizan en el retículo endoplasmático y se asocia con la cadena invariante I_i . Estos complejos se exportan a los compartimientos endocíticos por el aparato de golgi y se unen a los péptidos antigénicos para ser expresados en las células presentadoras de antígeno (Figura 26).

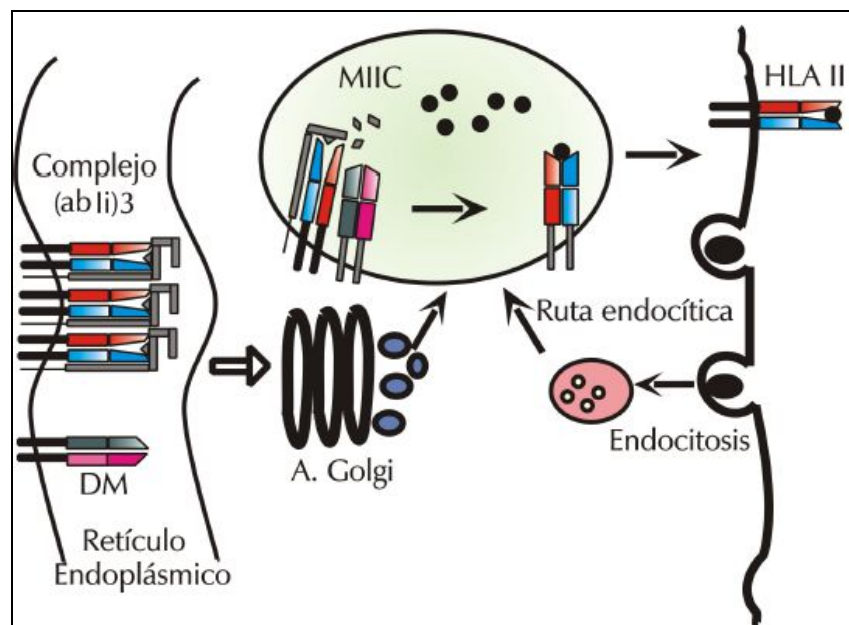


Figura 26. Presentación antigénica para HLA clase II,
Gómez-Casado *et al* ¹⁰⁷.

VIII. 3.3 OTRAS MOLECULAS HLA.

Existen otras moléculas de histocompatibilidad entre las que se destacan HLA-G, HLA-E y HLA-F (no clásicas o Ib), que presentan una gran homología con las moléculas clásicas del HLA clase I (HLA-A, HLA-B y HLA-C)¹⁰⁸. El polimorfismo genético de los genes HLA clase Ib es muy escaso en contraste con el alto polimorfismo de las moléculas de clase Ia y II.

El **HLA-E** es un ligando de un receptor inhibidor de citotoxicidad de las células NK y se expresa en diferentes tipos celulares como los antígenos de clase I¹⁰⁹. La hendidura del enlace HLA-E tiene gran afinidad para el péptido señal del HLA-G, y esta unión es importante para la expresión del HLA-E en la superficie del trofoblasto.

El HLA-E se transcribe en todos los tejidos humanos, pero su expresión en la superficie celular se expresa raramente, lo que impide una definición clara de su función¹¹⁰. Se une a un conjunto de péptidos restringidos autólogos y la mayoría se derivan de la secuencia líder de MHC clásica o de las moléculas de HLA-G. También se unen a péptidos derivados de patógenos, a proteínas del shock térmico (HSP 96)¹¹¹ y a otros péptidos complejos ligandos de linfocitos T. Se unen a los receptores inhibidores de NK y linfocitos T llamados CD94/NKG2A y CD94/NKG2C.

Funciona como un intermediario: si la célula está sana, se sintetizan proteínas HLA-A, B y C, con lo que el HLA-E tiene a su disposición péptidos para unirlos y expresarlos en la superficie celular, interactuar con los receptores CD94/NKG2 en las células NK y producir su inhibición¹¹². Si la célula se enferma por virus o tumores, se interrumpe el proceso mediador del HLA-E y se pierde la señal inhibitoria a la NK, se vuelve vulnerable y ocurre la lisis celular (Figura 27).

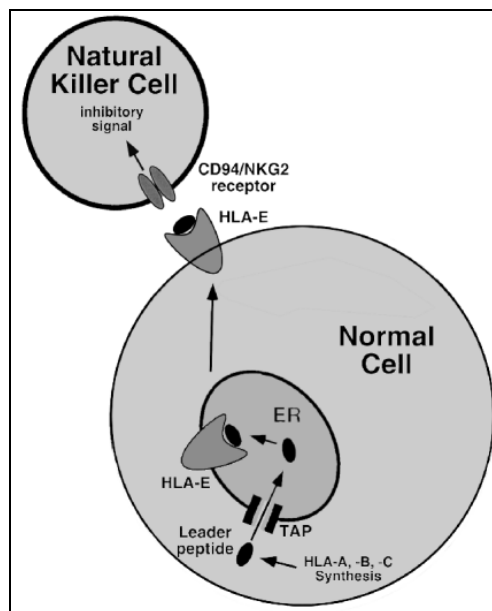


Figura 27. HLA-E y células NK, Navarro *et al*¹¹².

Presenta una estructura tridimensional parecida a las moléculas clásicas A, B y C, con sitios de unión conservados para la $\beta 2$ microglobulina y el CD8¹¹³. Inhibe la actividad citotóxica de las NK y linfocitos T¹¹⁰.

La expresión de HLA-E en tumores se demostró de manera indirecta ya que la lisis de las células cancerosas por las células T podría aumentar por el bloqueo

del receptor CD94/NKG2A¹¹⁴. La expresión del HLA-E puede representar un mecanismo de escape del tumor de la vigilancia inmune.

El **HLA- F** se expresa en amígdalas, bazo y timo¹¹⁵. Se unen a los receptores inhibidores de leucocitos. Se expresa en las células citotrofoblásticas invasivas, las cuales son las únicas que expresan las tres moléculas HLA clase Ib.

En la Figura 28 observamos la estructura génica de otros pseudogenes de la región clase I: HLA-H, HLA-J, HLA-K y HLA-L. Se sitúan en las proximidades del HLA-A y se desconoce si tienen alguna función biológica¹¹⁷. También existen genes truncados, denominados HLA-16, 75, 80 y 90. Existe una región HLA clase III, identificada con genes de los factores de complemento de la vía clásica, alternativa y TNF (α y β). Estos genes no tienen relación funcional o evolutiva con los antígenos HLA I o II.

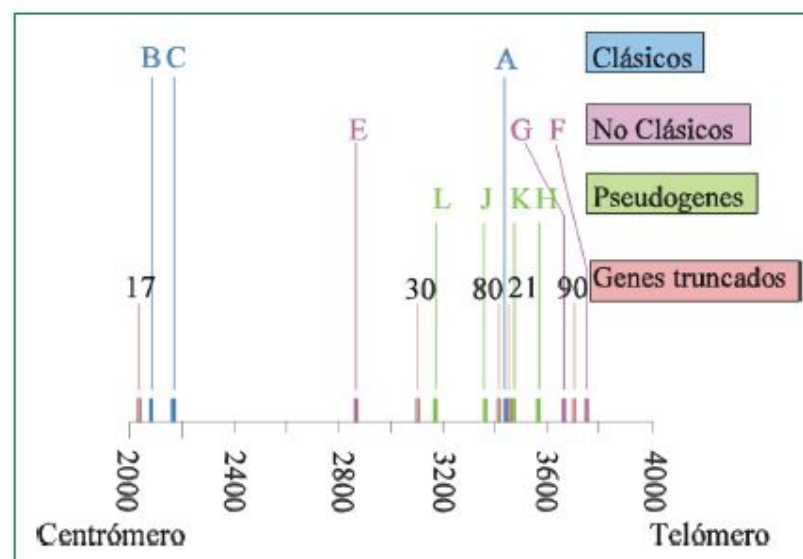


Figura 28. Estructura génica del HLA clase I, II y otros genes ¹¹⁷.

VIII 4. APLICACIONES DEL HLA.

VIII. 4.1 MÉDICAS.

VIII.4.1.1 EXPRESIÓN DE HLA EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES

El estudio del polimorfismo del HLA nos ayuda a comprender la susceptibilidad a patologías autoinmunes¹¹⁶. Se sabe que determinadas enfermedades se asocian con el incremento de la frecuencia de un determinado alelo HLA y son de etiología desconocida, crónicas y con agrupamiento familiar¹¹⁷. El HLA es un factor de susceptibilidad o marcador de riesgo identificado a pesar del polimorfismo y la ampliación de subtipos alélicos de clase I y II.

En la espondilitis anquilopoyética, existe una fuerte asociación con el antígeno de clase I: HLA-B27, y ciertos péptidos antigénicos forman complejos con ese HLA e inducen fenómenos de autoinmunidad¹¹⁸. Otras enfermedades se asocian con antígenos clase II (HLA-DR), como el lupus eritematoso sistémico y la diabetes tipo 1.

Varias hipótesis explican los mecanismos de asociación entre HLA y enfermedad:

- ✓ *Mimetismo molecular entre HLA y agentes infecciosos:* existen determinantes antigénicos cruzados entre *Klebsiella* sp., el HLA-B27 y la espondiloartropatías. Las células T se activan por mimetismo molecular,

ya que un determinante inmunogénico de un antígeno exógeno es estructuralmente similar a un determinante propio¹¹⁹.

- ✓ *Modificación de la estructura del HLA:* por agentes infecciosos o agentes químicos.
- ✓ *Antígenos HLA como receptores:* la presencia del HLA sobre la célula blanco es un requisito para que penetre el patógeno a la célula y se desarrolle la enfermedad.
- ✓ *Déficit en la respuesta inmune:* cualquier trastorno implica a antígenos HLA y su participación genética en la enfermedad.
- ✓ *Déficit de factores del complemento:* solo o en desequilibrio génico con una molécula HLA, se asocia a susceptibilidad de algunas enfermedades. El déficit del factor C2 del complemento se asocia con DR3 en LES, y el defecto en el gen CYP21 de la 21-hidroxilasa se asocia con HLA-B47 en la hiperplasia adrenal congénita.
- ✓ *Fallo en la selección, llamado también "agujero en el repertorio":* la selección positiva o negativa de linfocitos T autorreactivos o moléculas deficientes en la presentación de péptidos antigénicos contribuyen a la patogénesis de la enfermedad.

Las enfermedades autoinmunes constituyen desórdenes multifactoriales favorecidos por factores genéticos y ambientales. Los factores genéticos incluyen agrupamientos familiares, grupos étnicos, gemelos monocigotos y transmisión autosómica dominante¹²⁰.

El tipaje HLA es el análisis para conocer los alelos HLA de un determinado individuo mediante métodos serológicos, análisis de genes por biología molecular y métodos celulares¹²¹. Se utiliza en el estudio de la asociación de distintas formas clínicas de una enfermedad, como la diabetes tipo 1 y el HLA-DR3 y DR4 (Tabla 2).

<i>Enfermedad</i>	<i>HLA</i>	<i>RR</i>
<i>Síndrome de Reiter</i>	B27	37
<i>Espondilitis anquilosante</i>	B27	106
<i>Tiroiditis de Hashimoto</i>	B47	15
<i>Tiroiditis de Hashimoto</i>	DR5	3
<i>Esclerosis Múltiple</i>	DR15	5
<i>Artritis reumatoide</i>	DR4/DR10/DR21	4
<i>Diabetes tipo I</i>	DR3/DR4/DQ2/DQ8	3-6
<i>Enfermedad celíaca</i>	DQ2/DQ8	30

Tabla 2. Enfermedades más comunes asociadas con las moléculas HLA¹²¹.

Este estudio de relaciones presenta varios problemas, como son: los alelos asociados a una enfermedad también se encuentran en la población general sana, un solo alelo se puede asociar con más de una enfermedad y en una misma enfermedad no hay una asociación del 100% de los casos con un alelo.

Hasta que sea posible una definición más precisa de los productos del Complejo Principal de Histocompatibilidad, los estudios de asociación con enfermedad no tendrán más que interés académico, pero empiezan a tener un

lugar en las nuevas formas de diagnóstico y tratamiento de las enfermedades autoinmunes.

VIII. 4.1.2 EXPRESIÓN DEL HLA EN TUMORES

Los antígenos HLA clase I juegan un papel esencial en el reconocimiento de las células tumorales por el sistema inmune. Permiten el reconocimiento de las células malignas por las células NK y linfocitos T¹²².

El HLA-G podría favorecer a las células tumorales para el escape de la inmunovigilancia¹²³, como se ha visto en carcinomas de pulmón, linfomas cutáneos, tumores cerebrales y melanomas. Los mecanismos son un aumento de la expresión en la superficie de HLA-G, formas solubles que ejercen acciones inmunosupresoras a distancia e inducir la presencia de HLA-G en las células dendríticas para inhibir la respuesta inmune. Se detectan isoformas del HLA-G en tumores con altos niveles de transcripción y expresión génica, e inhibe la citólisis de las NK y la secreción de factores inhibitorios como la IL-10¹²⁴. Además, los factores del microambiente del tumor como la hipoxia y el TNF α regulan la expresión transcripcional del HLA-G y favorece el escape tumoral de la lisis por NK, así como cambios epigenéticos como la desmetilación del DNA e histonas de los genes¹²⁵.

La capacidad tolerogénica del cáncer debe ser tomada en cuenta en los tratamientos antitumorales. El HLA-G constituye un nuevo parámetro en el

diseño de dianas terapéuticas a fin de estimular la respuesta de las células T en la inmunoterapia de los tumores, como el INF α que induce su expresión¹²⁶.

Por otra parte, la presencia de HLA-G en sangre periférica procedente de las células tumorales o de las células presentadoras de antígeno, puede ser un marcador tumoral y contribuyen al estudio del pronóstico, presencia de metástasis y eficacia de los tratamientos oncológicos^{127,128}. Se está estudiando el papel del HLA-G como marcador de susceptibilidad a la quimioterapia del cáncer de ovario avanzado¹²⁹.

Los tumores digestivos tienen una gran plasticidad y pueden emplear diferentes armas inmunosupresoras para escapar del ataque inmune²³⁵. El conocimiento de los mecanismos por los que las células tumorales evaden al sistema inmune puede proporcionar en un futuro una aproximación terapéutica para los tratamientos oncológicos¹³⁰.

La **trogocitosis o sinapsis inmunológica** es un tipo de contacto entre las células que conducen a la sustitución de piezas de membrana y moléculas asociadas¹³¹. Los linfocitos T, B y NK conjugadas con células presentadoras de antígeno extraen moléculas de la superficie de estas células y las presentan en su propia superficie, constituyendo una forma de modulación del sistema inmune.

Se ha demostrado que el HLA-G puede ser adquirido por las células tumorales a través de trogocitosis activa de las células NK, lo que puede ser un mecanismo de escape inmune de los tumores HLA-G negativos¹³². Este mecanismo puede ser inhibido por el bloqueo de la molécula HLA-G o los receptores de superficie de las NK.

La Figura 29 es una representación esquemática para la terapia antitumoral dirigida contra la molécula HLA-G¹³³. Se puede actuar contra su transcripción (1), en la traducción del ARNm (2), interferir en la expresión superficial (3), bloquear la interacción entre el HLA-G del tumor y los receptores inhibidores ILT-2 y ILT-4 de las células presentadoras de antígenos (4), trogocitosis de fragmentos de membrana con HLA de células presentadoras de antígeno a las células T o de células tumorales a las NK (5) o por baja maduración de las células T supresoras (6). Las estrategias van dirigidas al bloqueo de la expresión del HLA-G o su función con anticuerpos específicos para mejorar el aclaramiento inmune de las células tumorales HLA-G positivas.

VIII.4.1.3 EXPRESIÓN DEL HLA EN TRASPLANTES

La comprensión de los mecanismos de tolerancia del sistema inmune materno hacia el semialoinjerto fetal está dirigida al avance en el campo de los trasplantes.

La práctica de trasplantes en clínica humana es el tratamiento final del fracaso renal, hepático, cardíaco o de médula ósea. Son alotrasplantes en los que la presencia de moléculas HLA distintas a las del receptor, provoca el desarrollo de anticuerpos y células T citotóxicas y conducen al rechazo. Si los HLA son compatibles, se reduce en gran medida la incidencia y severidad del rechazo y aumenta la supervivencia del injerto¹³⁴.

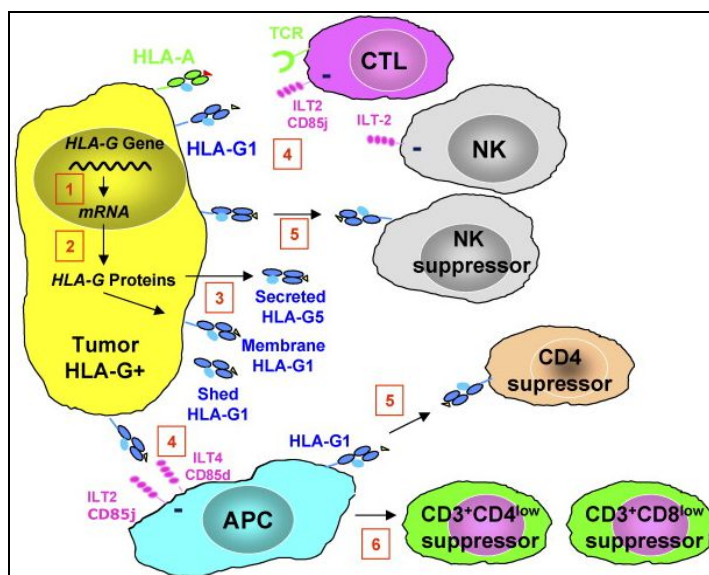


Figura 29. Dianas terapéuticas HLA-G en tumores, Hudrisier *et al*¹³³.

Todas las moléculas HLA pueden ser dianas del rechazo de trasplantes, aunque HLA-C y HLA-DP tienen bajo polimorfismo y menor importancia en los rechazos inmunes. El HLA-G presenta funciones de inmunotolerancia, por lo que su expresión puede contribuir a la aceptación del trasplante por inhibición de la lisis mediada por NK y linfocitos T citotóxicos, y la supresión de la respuesta alógena proliferativa¹³⁵.

La expresión de HLA-G soluble en el suero y los injertos de corazón¹³⁴, hígado¹³⁶, pulmón y riñón¹³⁷ se asocian con mejor pronóstico del trasplante y menos fenómenos de rechazo. El genotipo homocigoto para el polimorfismo 14-pb induce altos niveles de expresión de HLA-G soluble y menor incidencia de rechazo del injerto trasplantado¹³⁸. Estos antígenos solubles pueden prolongar la supervivencia del trasplante por inhibición de los linfocitos T citotóxicos aloreactivos, que se unen a los receptores de células T CD8 e inducen apoptosis de las células citotóxicas y las NK. Es decir, el HLA-G podría ser un posible marcador clínico y terapéutico para el pronóstico de los trasplantes de órganos y terapia tolerogénica¹³⁹.

El rechazo agudo y la enfermedad de injerto contra huésped son enfermedades mediadas por linfocitos T por diferencias HLA entre el donante y el receptor¹⁴⁰. En el rechazo agudo, existen anticuerpos anti-HLA preformados en el receptor antes del trasplante, por transfusiones de sangre previas (con linfocitos del donante), anti HLA durante la gestación (contra los HLA paternos del feto) y trasplantes previos. En la disfunción crónica del órgano trasplantado existen anticuerpos anti-HLA en el receptor contra las moléculas HLA en el endotelio del trasplante¹⁴¹.

Es fundamental realizar una prueba de reacción cruzada entre células del donante y suero del receptor, para detectar la presencia de anticuerpos anti-HLA preformados en el receptor y evitar el rechazo agudo. Se verifica la compatibilidad del HLA-A, B y DR; cuanto mayor es la compatibilidad HLA

mayor es la supervivencia del mismo. La compatibilidad total solo existe entre gemelos idénticos, pero existen bases de datos a nivel mundial para optimizar la compatibilidad HLA entre un donante potencial y el paciente. Actualmente el desarrollo de métodos de tipaje de alta resolución sobre DNA de cada locus HLA, tiene mejores resultados en los trasplantados¹⁴².

La supervivencia del injerto es mayor entre individuos emparentados HLA compatibles que entre no emparentados con el mismo grado de compatibilidad HLA, ya que el polimorfismo del sistema es tan elevado que puede haber diferencias que no se aprecian con el tipaje serológico. Normalmente se estudian 4 loci del HLA (HLA-A, B, C y DRB1). Debido al desequilibrio de ligamiento entre todos los genes HLA, los loci no estudiados son diferentes entre individuos no emparentados.

La enfermedad injerto contra huésped es una complicación específica del trasplante de progenitores hemopoyéticos, producida por los linfocitos T del donante¹⁴³. Las células dendríticas del receptor presentan aloantígenos en el contexto HLA a los linfocitos T CD4+ del donante, que se activan y liberan IL-2 que a su vez activan linfocitos T CD8+, responsables del daño de las células del receptor con antígenos HLA clase I. Intervienen las NK y los macrófagos liberando citoquinas e INF γ que aumenta la expresión del HLA (Figura 30).

En la prevención del rechazo se puede actuar a distintos niveles: buscando la máxima compatibilidad posible y asegurándose de que el receptor no tenga

anticuerpos preformados contra los antígenos HLA del donante, además del uso de terapia inmunosupresora¹⁴⁵.

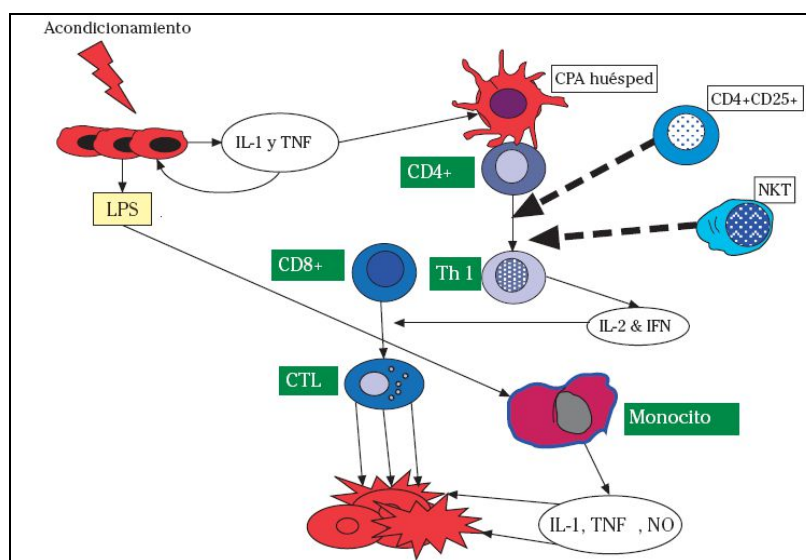


Figura 30. Enfermedad de injerto contra huésped, Rifón *et al*¹⁴⁴.

VIII.4.1.4 EXPRESIÓN DE HLA EN INFECCIONES VIRALES

Los virus tienen diversas estrategias para evitar su reconocimiento y destrucción por el sistema inmune del huésped. Una de ellas es regular la expresión de HLA clase I, disminuyendo la expresión del HLA-A y B, la cual inhibe la destrucción de las células infectadas por los linfocitos citotóxicos y el escape a la acción de las NK por aumento de la expresión HLA-G soluble y de membrana¹⁴⁶, como en el HIV¹⁴⁷, CMV¹⁴⁸, virus de la rabia¹⁴⁹ y el herpes simple¹⁵⁰.

En pacientes infectados por HIV, la expresión del HLA-G soluble está aumentada, ya que evade la citotoxicidad de las células inmunes, además que existe asociación con variantes genéticas HLA-G y mayor susceptibilidad a este virus¹⁵¹. El CMV induce la expresión de HLA-G soluble en los monocitos infectados¹⁵². Los virus neurotrópicos como el herpes y la rabia aumentan la expresión neuronal de HLA-G¹⁵³.

Las personas que tienen una inmunidad natural al HIV son portadoras del gen HLA-B57, las cuales poseen un número mayor de linfocitos T que se unen a más proteínas del HIV y les confiere protección contra la infección¹⁵⁴. Este mecanismo podría llevar al desarrollo de vacunas. Además, se ha visto que el polimorfismo 14-bp del HLA-G se asocia con mayor susceptibilidad de infecciones virales tipo CMV¹⁵⁵.

Los antígenos HLA-G son producidos durante la reactivación vírica en macrófagos generados después de la estimulación alogénica de los virus latentes en monocitos de sangre periférica infectados. La inducción de moléculas del HLA-G pueden ser un mecanismo adicional que ayuda a los virus a subvertir las defensas del huésped, favorecer la diseminación del virus y exacerbar la severidad de las enfermedades virales¹⁵⁶.

VIII. 4.1.5 EXPRESIÓN DE HLA EN PROCESOS INFLAMATORIOS

La expresión HLA-G se reportó en dermatitis atópica¹⁵⁷, psoriasis¹⁵⁸, miopatías¹⁵⁹, enfermedad celíaca¹⁶⁰, enfermedad de Crohn¹⁶¹, asma¹⁶², artritis reumatoide¹⁶³ y esclerosis múltiple¹⁶⁴. El polimorfismo 14-bp se asocia con mayor frecuencia en pacientes con sarcoidosis¹⁶⁵, artritis reumatoide, LES y pénfigo⁸⁹.

Los niveles de HLA-G disminuidos se correlacionan con la actividad de la enfermedad inflamatoria⁸⁹. El INF γ induce su expresión en la superficie y sobrerregula a las diferentes isoformas. Los efectos beneficiosos son debido a la restauración de la expresión del HLA-G por los monocitos y ejercen efecto tolerogénico inmune¹⁶⁶.

La esclerosis múltiple es una enfermedad inflamatoria, desmielinizante y neurodegenerativa crónica del SNC, de etiología desconocida. Ocurre un ataque combinado de la respuesta inmune innata y adquirida contra las proteínas de la mielina de las neuronas. La molécula HLA-G soluble aumentada en el líquido cefalorraquídeo coincide con remisiones de la enfermedad. Además, la activación de la esclerosis múltiple postparto ocurre por disminución de los niveles de HLA-G¹⁶⁷. El tratamiento con INF β produce un incremento en la expresión del HLA-G en los monocitos de la sangre periférica y beneficios en esta patología autoinmune¹⁶⁸. Este conocimiento

permite encontrar mejores estrategias terapéuticas frente a esta enfermedad neurológica.

La artritis reumatoide es una enfermedad crónica, inflamatoria y autoinmune que destruye el cartílago articular. Existen niveles bajos de HLA-G en comparación con individuos sanos. Mejora clínicamente durante la gestación, ya que es una enfermedad inmune con predominio TH1 y en la gestación, el perfil de citoquinas es tipo TH2¹⁶⁹.

La farmacogenética de los polimorfismos HLA-G tiene aplicaciones en la terapia de la artritis reumatoide. La administración de metotrexate reduce la fase activa de la enfermedad por aumento de IL-10, que induce la expresión de HLA-G en la superficie de los monocitos, y las formas solubles, que estimulan la expresión de IL-10 en las mononucleares de la sangre periférica¹⁷⁰. El polimorfismo homocigoto 14-bp se relaciona con menor producción de HLA-G soluble y bajos niveles de IL-10, por lo que el metotrexate es beneficioso ya que aumenta ambos parámetros¹⁷¹. Este polimorfismo representa un marcador de respuesta terapéutica en la artritis reumatoide.

La expresión de HLA-G en niveles bajos en el páncreas se asocia a diabetes mellitus¹⁷². La activación de las células T autorreactivas en los islotes pancreáticos donde se libera la insulina por exocitosis depende de la densidad superficial de HLA-G, ya que es una molécula tolerogénica¹⁷³. Estos hallazgos

tienen implicaciones potenciales para la prevención de la diabetes y el establecimiento de la tolerancia a trasplantes de islotes pancreáticos.

En la Figura 31 vemos el efecto de HLA-G en el equilibrio de TH1 y TH2⁸⁹. El INF γ y la IL-10 inducen la expresión de HLA-G soluble y de membrana por los macrófagos y monocitos activados, y polariza la respuesta a TH2, ya que aumenta la liberación de IL-3, IL-4 e IL-10. Estos efectos del HLA-G tienen implicaciones importantes para el equilibrio TH1/TH2 en patologías autoinmunes.

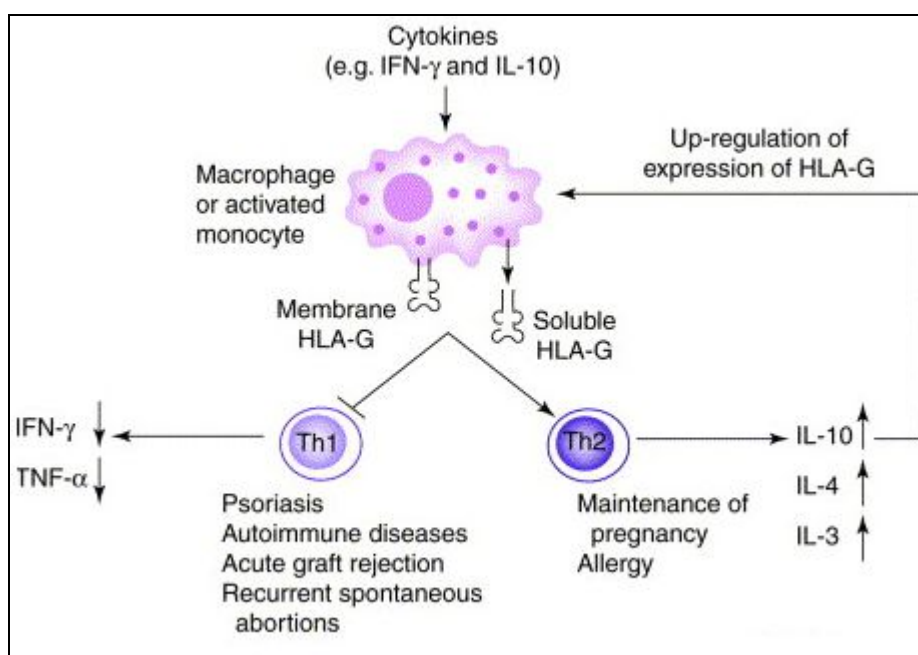


Figura 31. HLA y respuestas TH1 y TH2, Piccinni *et al*¹⁷⁴.

VIII.4.1.6 MEDICINA REGENERATIVA.

Es una nueva rama de la medicina, basada en las células madres y su capacidad pluripotencial. Las células madre han creado grandes expectativas

terapéuticas, para uso clínico mediante aplicación autóloga en la regeneración de los tejidos. Su procedencia alogénica en la actualidad es una gran limitante, por las conocidas diferencias en el sistema de histocompatibilidad HLA. Puede resolverse a largo plazo con el desarrollo de métodos de inmunotolerancia o uso de células madre del propio paciente, que equivale a un autotrasplante sin problemas.

Uno de los requisitos para el uso de las células madre en nuevas estrategias terapéuticas, es el conocimiento de su interacción con el sistema inmune del huésped. La expresión del HLA-G en plasma después de un trasplante de células madre hematopoyéticas se correlaciona con menos fenómenos de rechazo. Debemos conseguir nuevas estrategias terapéuticas para mejorar el funcionamiento de los injertos en el receptor.

VIII.4.1.7 REPRODUCCIÓN ASISTIDA

El HLA-G desempeña un papel de tolerancia inmunológica en la interfase materno-fetal. En programas de reproducción asistida en los que se cultivan embriones in vitro, ha cobrado interés la detección de las isoformas solubles de esta molécula por métodos de Elisa en el medio de cultivo. Desde el punto de vista inmunológico, el embrión es un injerto semialogénico e incluso alogénico en caso de recepción ovocitaria y embrionaria¹⁷⁵.

La selección de embriones para la transferencia intrauterina se basa en los criterios morfológicos en día +2 y +3 después de la fertilización. Algunos estudios ha detectado HLA-G en la superficie embrionaria y en los medios de cultivo y su relación con el éxito reproductivo^{176,177}. El valor de corte para considerar HLA-G positivo en el medio de cultivo es 0,1 U/ml.

No se ha encontrado relación entre los niveles de HLA-G y la clasificación morfológica de los embriones pero si hay relación con las tasas de implantación y gestación. La posibilidad de implantación en embriones HLA-G positivos es de un 60% y la tasa de gestación clínica un 29%. En aquellos embriones HLA-G negativos, la tasa de implantación es de un 29% y 14% llegan a ser gestaciones clínicas, siendo estadísticamente significativo¹⁷⁸.

Es decir, la cuantificación de HLA-G soluble en cultivo embrionario podría ser un buen complemento de la selección morfológica de los mismos (indicador de calidad) y es útil como marcador predictivo para incrementar la tasa de gestación, disminuir el número de embriones transferidos y la tasa de embarazos múltiples¹⁷⁹. Varios estudios han demostrado que el HLA-G se expresa en los ovocitos y está presente en el líquido folicular que contribuye a la maduración de los mismos^{180,181}.

Los efectos de la progesterona sobre la expresión génica de HLA-G observados en cultivos celulares in vitro podrían explicar los efectos inmunomoduladores de esta hormona sobre la tolerancia inmunológica en el

embarazo. La progesterona es una hormona esteroidea que estimula el crecimiento y diferenciación del endometrio para la implantación e inhibición de las contracciones miométriales. Diversos estudios señalan que la progesterona exógena incrementa los niveles de expresión de ARNm de HLA-G en cultivos embrionarios a través de la regulación de la transcripción génica^{182,183}. Está pendiente determinar la influencia de los protocolos hormonales de estimulación ovárica en los niveles de HLA-G y el resultado final de la reproducción asistida.

VIII. 4.1.8 VACUNAS

Las vacunas constituyen una alternativa viable y efectiva para el control de las enfermedades infectocontagiosas. Una estrategia exitosa para el diseño de vacunas debe tener en consideración la respuesta inmune de la población heterogénea y su forma de reconocer y presentar los antígenos de los patógenos.

Ya conocemos el papel crucial del HLA en la presentación de los antígenos a los linfocitos T junto con el reconocimiento de lo propio y lo extraño. La identificación de epítomos que conducen a la efectiva activación de linfocitos T colaboradores y citotóxicos es el fin principal de los nuevos candidatos a vacunas, dada la simplicidad para su síntesis, su bajo coste y su capacidad para generar respuesta inmune contra microorganismos complejos¹⁸⁴.

Las vacunas basadas en péptidos químicamente fabricados (vacunas sintéticas) es una alternativa para la inmunoprofilaxis de las enfermedades infecciosas. Un epítipo ideal debe ser capaz de interactuar con los haplotipos del HLA clase II. Aunque la interacción de estos péptidos con moléculas extremadamente polimórficas como las HLA clase II representa uno de los mayores obstáculos para la identificación de péptidos universales y diseño de vacunas sintéticas, muchos trabajos recientes como los estudios de cristalografía de rayos X, que permiten ver el bolsillo de unión de los alelos, los ensayos in vitro entre péptidos y moléculas HLA purificadas, la caracterización por mapeo de respuestas de células efectoras, la identificación de residuos críticos para la interacción del péptido con el TCR del receptor y el reciente aporte de la informática al campo de la inmunología, ha hecho posible la identificación de "matrices virtuales" HLA clase II y conocer mejor estas interacciones complejas¹⁸⁵.

La caracterización de péptidos exógenos con capacidad de unión a varios alelos (promiscuidad de unión) presentes en varias poblaciones y su posible asociación con resistencia o susceptibilidad a enfermedades infecciosas, son una herramienta muy poderosa para diseñar vacunas sintéticas combinando fragmentos de longitud variable. Se busca asegurar una protección duradera y efectiva frente a los microorganismos patógenos en cualquier población.

El estudio del HLA humano y las investigaciones en los primates no humanos, han permitido observar la gran homología entre ciertos genes de los dos

grupos. Las equivalencias alélicas se han documentado de acuerdo a la hipótesis de trans-especie, que dice que los genes actuales HLA han evolucionado a partir de alelos ancestrales comunes a varias especies¹⁸⁶.

Cada familia génica se ha especializado pero mantiene algunos rasgos estructurales y funcionales, y se presentan diferentes grados de polimorfismo alélico y del haplotipo en cada uno de ellos. Por ejemplo, los primates de la especie *Aotus spp* han sido ampliamente utilizados para la evaluación de antígenos candidatos a vacunas, como la de la malaria causada por el *P. falciparum*¹⁸⁷. Mediante estrategias de biología molecular, se ha determinado la estrecha relación estructural de las moléculas clase I y del HLA-DQ, DR, y DP de este primate con el humano. Esto nos ayuda a los estudios de búsqueda de vacunas eficaces para el tratamiento de diversas enfermedades humanas.

VIII.4.1.9 MEDICINA PREVENTIVA

Permite una vigilancia estrecha de aquellos individuos que presenten un haplotipo sospechoso de una enfermedad, para tomar medidas preventivas en el estilo de vida, revisiones médicas periódicas, etc. Por ejemplo, el haplotipo HLA-DR3 y DR4 se asocia a diabetes mellitus tipo 1, LES, dermatitis herpetiforme y miastenia gravis. Permite estudiar la susceptibilidad a padecer ciertas enfermedades en una población, como el cáncer, las enfermedades autoinmunes y cardiovasculares.

VIII.4.2 APLICACIONES NO MÉDICAS

VIII. 4.2.1 MEDICINA LEGAL

En el campo de la medicina forense, las técnicas de tipificación del HLA permiten la investigación de la identidad de un individuo en el marco médico-legal, gracias a los aportes de la genética molecular. Además en los casos de paternidad sospechosa, para filiaciones familiares, ya que es improbable que dos personas no relacionadas genéticamente posean los mismos antígenos HLA. Su poder de discriminación supera el de otros sistemas de genes o proteínas.

VIII.4.2.2 ANTROPOLOGÍA

El sistema HLA es ideal para el estudio de poblaciones porque se trata de un sistema polimórfico con grandes diferencias de frecuencias alélicas entre humanos. Los antígenos se heredan como haplotipos completos en forma codominante y se favorece disequilibrios genéticos que provocan mayores frecuencias de un haplotipo particular en una población.

La determinación del HLA es muy útil en la caracterización de la estructura genética de las poblaciones, ya que la frecuencia de sus alelos varía de un grupo étnico a otro. Nos permite reconocer genes autóctonos de los adquiridos por entrecruzamientos poblacionales. Confiere ventaja evolutiva, ya que el

mayor polimorfismo del complejo mayor de histocompatibilidad hace a las especies más resistentes.

En conclusión, el HLA-G tiene roles opuestos: es beneficioso en el embarazo, trasplante y patologías autoinmunes, pero perjudicial en el cáncer y las infecciones virales, además que es útil como marcador biológico de las enfermedades¹⁸⁸. El diseño de las terapias HLA-G depende del contexto: con reguladores positivos de la expresión de HLA-G para un entorno tolerogénico, o permitir el aclaramiento inmune de las células tumorales e infectadas por virus, bloqueando el ARNm o su función con anticuerpos neutralizantes.

VIII.5 EXPRESION HLA-G.

La secuencia y el gen del HLA-G tiene gran similitud con los genes del HLA clase I clásicos, tiene 8 exones, 7 intrones, excepto por un codón de parada en el exón 6 que difiere de los otros (Figura 32).

La molécula HLA-G pertenece a la familia de las moléculas de histocompatibilidad de clase I no clásicas, y se caracteriza por un polimorfismo restringido, una distribución tisular limitada al trofoblasto fetal¹⁹⁰, células del epitelio tímico¹⁹¹, córnea¹⁹², páncreas¹⁹³, células eritroides y endoteliales¹⁹⁴, y sus propiedades biológicas que permiten la tolerancia inmune. En un contexto patológico se expresa en trasplante de órganos, tumores, infecciones virales y enfermedades inflamatorias y autoinmunes.

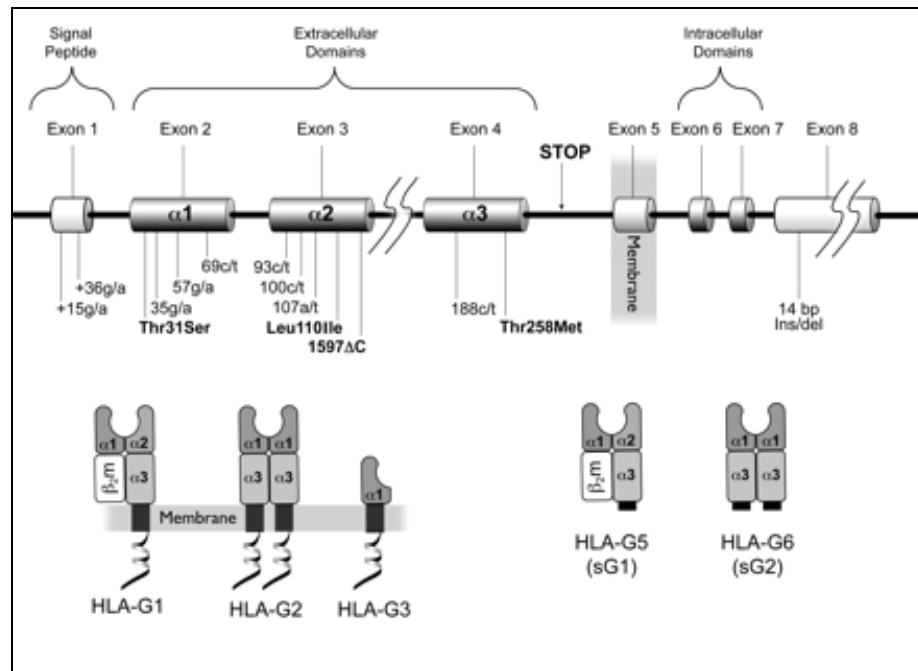


Figura 32. Gen HLA-G e isoformas, Hiby *et al*¹⁸⁹.

El HLA-G está relacionado con la inducción de tolerancia materno-fetal. Se localiza en el trofoblasto extraveloso favorecido por la IL-10, que participa en la producción de citoquinas por parte de los macrófagos de la interfase. Es capaz de inhibir la actividad de las células NK de los leucocitos de la decidua y disminuir los linfocitos T citotóxicos durante la respuesta de proliferación de células T en la reacción primaria alogénica.

VIII.6 ISOFORMAS HLA-G

La molécula HLA-G puede presentarse en 7 isoformas codificadas por splicing alternativo del m-RNA precursor, 4 de ellas son proteínas unidas a la membrana (HLA G1, G2, G3, G4) y otras 3 isoformas son proteínas solubles (HLA G5, G6 y G7)¹⁹⁵ (Figura 33).

La isoforma HLA-G1 presenta los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ (asociados con $\beta 2$ microglobulina) que codifica para el dominio extracelular, unidos al dominio transmembrana y un codón de parada en el exón 6. Los transcritos HLA-G2, G3 y G4 no incluyen el exón 3, exón 3 y 4 o exón 4 respectivamente, generando isoformas truncadas²⁵². Los mecanismos para generar las proteínas solubles alternas del HLA-G incluyen, un codón de parada en el intrón 4 para las isoformas G5 y G6, mientras que G7 presenta un codón de parada en el intrón 2¹⁹⁷.

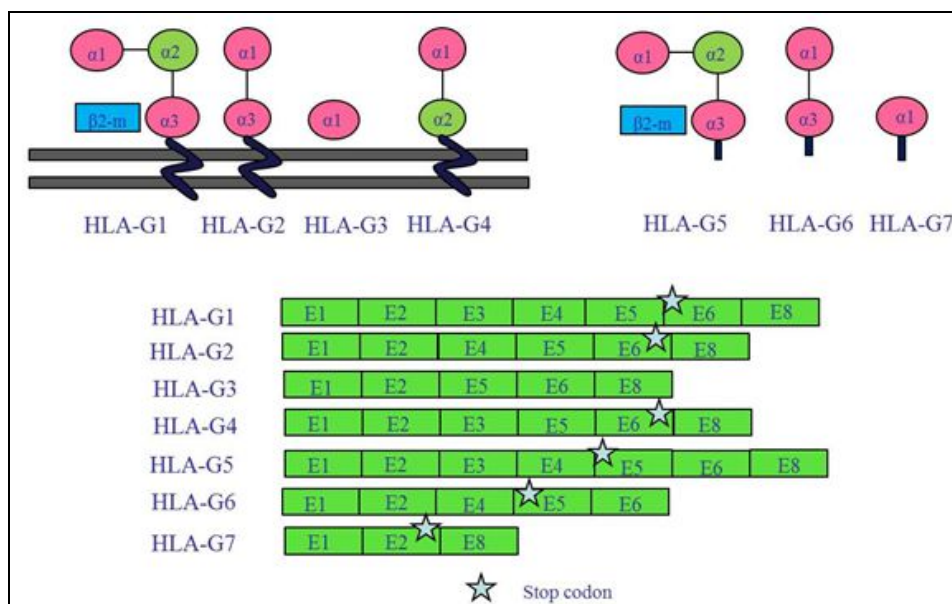


Figura 33. Isoformas HLA-G, López-González *et al*¹⁹⁶.

La función primaria del HLA-G1 es actuar como inmunomodulador. Es reconocido por receptores ILT2, ILT4 y KIR2DL4 expresado en células mielomonocíticas, células T y dendríticas¹⁹⁸. Afecta la producción de citoquinas de los linfocitos grandes de la decidua en la respuesta TH1/TH2.

Las isoformas cortas de HLA-G2, G3 y G4, son producidas intracelularmente, secuestradas en el retículo endoplasmático y no llegan a la superficie de la célula. Funcionan solo para apoyar la expresión de HLA-E y modulan la interacción con CD94/NKG2. La isoforma HLA-G5 se ha descrito en líquido amniótico¹⁹⁹, sueros de gestantes, pacientes con cáncer y trasplantados. HLA-G6 y G7 se presenta en sangre materna durante la gestación²⁰⁰.

Todas las isoformas del HLA-G, ligadas a la membrana y solubles, tienen en común el dominio $\alpha 1$ de la región extracelular, permitiéndoles mediar la protección de las células T y NK mediante citólisis²⁰¹. Se ha encontrado expresión del HLA-G en macrófagos, células dendríticas, epitelio tímico, cámara anterior del ojo, tumores de pulmón, mama²⁰², linfomas cutáneos, al igual que en enfermedades inflamatorias pulmonares, y tejido trasplantado. La presencia de moléculas de tipo soluble en plasma y líquido amniótico, en biopsia de tumores y en suero de pacientes trasplantados podría implicar que estas isoformas actúan como mecanismos de tolerancia inmune en el embarazo y la progresión de tumores y trasplantes.

La expresión del HLA-G también ha sido determinada en las células dendríticas de sangre periférica, no encontrando transcritos de membrana ni solubles. Durante la diferenciación de las células dendríticas a formas maduras, hay una expresión parcial en la superficie con una secreción sustancial de isoformas de HLA-G cuando se induce la misma²⁰³.

La mayoría de las células mieloides expresan G1 y G5, mientras que las células plasmacitoides expresan principalmente G1. Esto explica la diferencia de expresión en la superficie celular e intracelular de HLA-G, ya que el anticuerpo monoclonal utilizado reconoce solo isoformas G1 en la superficie y G5 intracelular²⁰⁴.

Las **moléculas solubles del HLA-G** son secretadas por las vellosidades del citotrofoblasto y se han detectado niveles basales en suero materno y líquido amniótico. Se le atribuye funciones inmunosupresoras, modulando la liberación de citoquinas desde las células mononucleares deciduales, activando a los CD8+ e inhibiendo la proliferación de los CD4+. Regulan la capacidad invasiva del blastocisto y determinan la implantación del huevo (Figura 34).

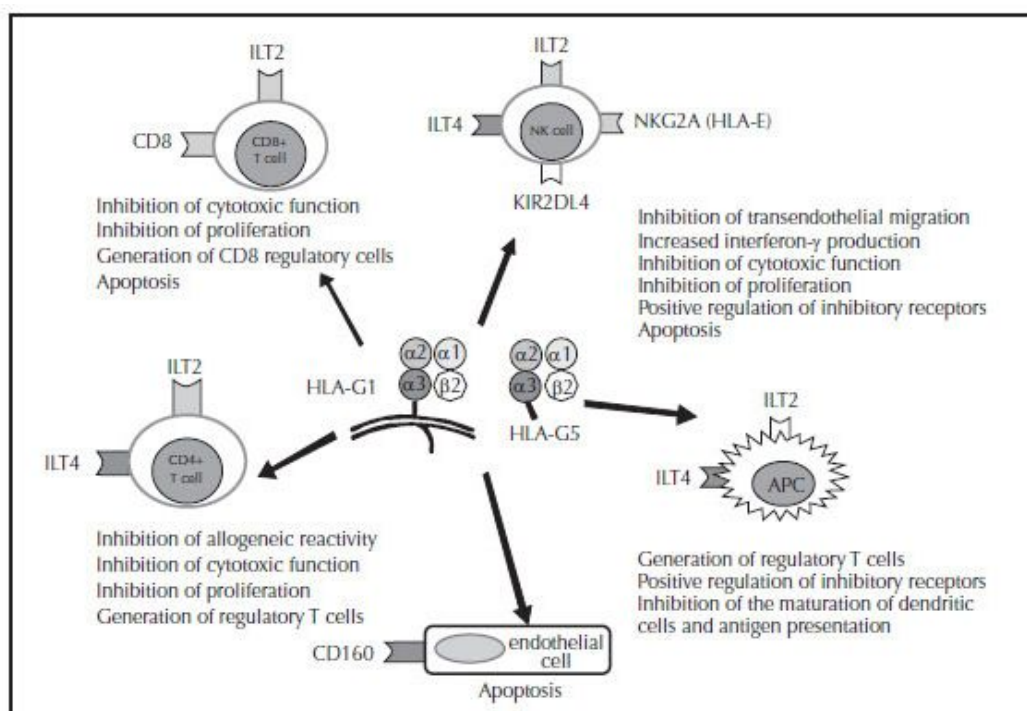


Figura 34. Función de las isoformas HLA-G, Fucci *et al*²⁰⁵.

El HLA-G5 puede ser blanco de la apoptosis de las CD8+ activas por la interacción con la molécula CD8. El HLA-G5 se expresa en la placenta, y tiene otras funciones como la de eliminar CD8 alorreactivos maternos de las células T en la interfase materno-fetal.

VIII.7 DETERMINACION DE NUEVOS ALELOS HLA-G

El polimorfismo de la molécula HLA es el resultado de un largo proceso de evolución a lo largo de miles de millones de años como consecuencia de la presión evolutiva ejercida por agentes infecciosos. Para generar este elevado polimorfismo, la molécula HLA ha utilizado diferentes mecanismos que contribuyen a formar nuevos alelos²³³.

Algunos son resultados de mutaciones puntuales y otros proceden de la combinación de secuencias completas entre diferentes alelos, bien mediante un proceso de recombinación génica o por conversión génica, según el cual una secuencia es reemplazada por otra semejante de un gen homólogo. La recombinación entre alelos del mismo locus parece ser el mecanismo más frecuentemente utilizado para la creación del polimorfismo y así, muchos alelos diferentes pueden proceder de procesos de recombinación repetidos a partir de un pequeño número de genes ancestrales. La existencia de este proceso evolutivo apoya que el polimorfismo es esencial para los antígenos de histocompatibilidad.

En la región genética del HLA-G pueden ocurrir variaciones a nivel genético producidas por sustituciones de bases o SNP (single nucleotide polymorphism) que pueden dar lugar a cambios en el tipo de aminoácido que constituye la proteína HLA-G o incluso deleciones que provoquen un corrimiento en la pauta de lectura aminoacídica²⁴⁸.

Actualmente se han definido 46 alelos en el locus del HLA-G, dos de ellos son nulos (HLA-G*0105N y HLA-G*0113N)²³⁴ basados en una variación de la secuencia y 15 alelos a nivel de proteína (<http://ebi.ac.uk.imgt/hla>)²³³.

Está en aumento las investigaciones sobre las variaciones en la secuencia del HLA-G debido al papel que tiene en el embarazo. Hasta hoy, se han detectado cerca de 72 SNP desde el exón 1 al intrón 6. La presencia de variaciones puntuales en el gen HLA-G puede implicar alteraciones en la secreción de la proteína. Una única deleción o un cambio de base en el gen del HLA-G podrían estar relacionados con la pérdida temprana de la gestación²³³. Por ejemplo, la deleción de una C en el codón 130 que genera el alelo HLA-G*0105N, o el cambio de base del codón 110 que genera el alelo HLA-G*0104 están asociados significativamente con el riesgo de aborto.

Sin embargo, a pesar de que un único cambio pueda o no afectar las funciones del HLA-G, la mayoría de los SNP están localizados fuera de la parte de la molécula que tiene relevancia funcional o se dan en la tercera base que codifica el codón, de manera que no repercute en el cambio de un aminoácido.

En general, es el exón 2 y 3 que codifican el dominio $\alpha 1$ y $\alpha 2$, donde se presentan los polimorfismos más frecuentes, mientras que el exón 4, dominio $\alpha 3$, es el más conservado.

En concreto, hay determinadas regiones del HLA-G que deben estar más conservadas genéticamente debido a su importancia funcional, como es el caso de algunas posiciones aminoacídicas del exón 2 que constituyen el dominio $\alpha 1$ que sirven como ligando para los receptores inhibitorios KIR2DL4 de las células NK, o la zona de unión a la molécula CD8 de los linfocitos T formada por determinadas posiciones del exón 4, correspondiente con el dominio $\alpha 3$. A continuación mostramos los polimorfismos más importantes localizados a lo largo de la secuencia genética del HLA-G.

- **Polimorfismo en la región del promotor (Región 5'UTR):** la región promotora del HLA-G es única entre el resto de los HLA. Se han encontrado cerca de 30 SNP en esta región, en el extremo 5'UTR²⁴⁷. Esta región está localizada 1.5 Kb antes del inicio de la transcripción del HLA-G (figura 35).

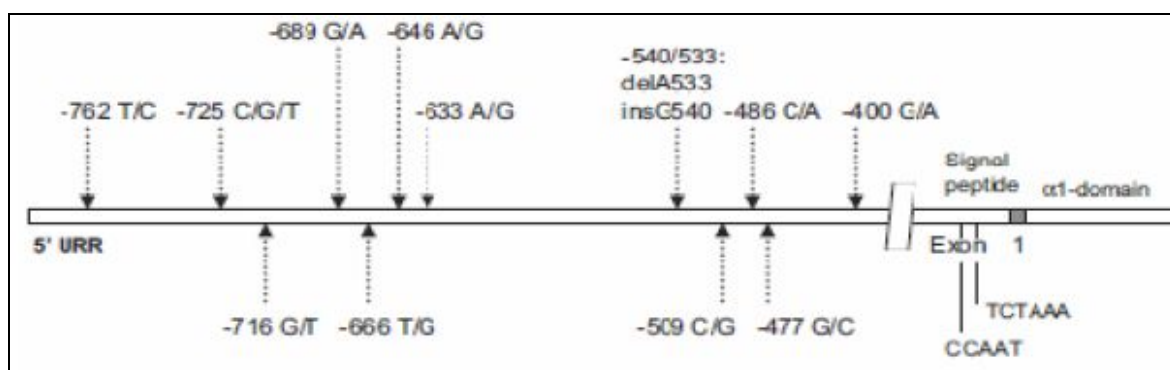


Figura 35. Polimorfismos en la región 5'UTR y exón 1²⁰¹.

La región promotora del HLA-G contiene múltiples elementos regulatorios *cis*, por lo tanto, los polimorfismos de esta región pueden afectar la unión de factores nucleares o factores de transcripción a la región regulatoria y al sitio de inicio de la transcripción, viéndose afectada la eficiencia en la regulación transcripcional del HLA-G y afecta los niveles de expresión de HLA-G soluble.

Existe un fuerte desequilibrio de enlace en la zona del promotor del gen HLA-G. Debido a esto, es posible realizar una asociación entre un determinado haplotipo del HLA-G (que contiene múltiples SNP) y los abortos de repetición, de manera que la concentración de variaciones polimórficas en el promotor puede incrementar el riesgo de pérdidas gestacionales, quizás por una alteración en la unión de factores de transcripción que conllevan a cambios en la expresión de las proteínas¹⁹⁵.

También, se ha visto un fuerte desequilibrio de enlace entre los polimorfismos que ocurren en el promotor 5'UTR con las variantes de la región 3' UTR, las cuales se asocian con cambios en la estabilidad del ARNm. Finalmente se deduce que tanto una expresión deficitaria como una sobre expresión de HLA-G pueden ser perjudiciales en la gestación.

- **Polimorfismos en el exón 1:** el exón 1 codifica para el péptido líder (secuencia de aminoácidos implicados en el traslado de las proteínas) el cual tendrá importancia en la expresión y estabilidad del HLA-E. Estos cambios en

el tipo de aminoácidos del péptido líder del HLA-G (residuos 3-11), podrían implicar fallos en el HLA-E.

- **Polimorfismos en el exón 2:** el exón 2 codifica para el dominio $\alpha 1$ de la molécula de HLA-G. Se han detectado un elevado número de mutaciones en este exón. Algunas están muy conservadas evolutivamente y no representan un cambio de importancia funcional²⁵⁶. El codón 31 es responsable de formar la hendidura de presentación de antígenos y exhibe un mayor grado de variación en la secuencia de nucleótidos que el resto de las regiones, aunque algunas posiciones de esta región deben mantenerse conservadas. El polimorfismo del codón 31 define el alelo HLA-G*0103.

Otras variaciones en el exón 2, dominio $\alpha 1$, podrían tener repercusión en la funcionalidad de la proteína HLA-G. Los residuos 76-80 de este dominio interactúan con los receptores inhibidores KIR2DL4 de las células NK, llevando a cabo la función de inmunosupresión del HLA-G. Debido a ello, se piensa que esta zona concreta del exón 2 evolucionó hasta ser una región constante y sin polimorfismos.

El polimorfismo del codón 57 ha sido uno de los codones más estudiados dentro del exón 2. Consiste en un cambio de CCG por CCA, la cual es una mutación silente de prolina por prolina, pero al estar presente en el límite entre un intrón y un exón, puede ser importante en la regulación del fraccionamiento del ARNm del HLA-G.

Uno de los polimorfismos con consecuencias más graves encontrados en el exón 2, es el polimorfismo en el codón 54, que consiste en un cambio del codón CAG por TAG que es un codón stop prematuro, generando un alelo nulo denominado HLA-G*0113N y una proteína truncada o no completa y no funcional. No se forma ninguna isoforma, ni soluble ni asociada a la membrana. La selección natural actúa en contra de la generación de este tipo de mutación y de los alelos nulos. Parece no haber asociación entre los polimorfismos del exón 2 y los abortos recurrentes.

- **Polimorfismos del exón 3:** la mayoría de las mutaciones puntuales de la molécula de HLA-G en la población sana están descritos en el exón 3, que codifica para el dominio $\alpha 2$. A pesar de la elevada cantidad de variaciones encontradas, las que tienen más importancia en la transcripción, la conformación de la molécula HLA-G y su expresión superficial son:

1.- **Codón 93:** la sustitución de la tercera base (CAC por CAT) origina una sustitución sinónima de histidina por histidina. Debido al fuerte desequilibrio de enlace que existe dentro de la región genética del HLA-G, se estudian algunos polimorfismos en conjunto como el caso del codón 93 con las 14bp INDEL.

El alelos HLA-G*010101 con una CAC en el codón 93, es decir, ausencia de polimorfismo, junto con la delección de 14bp en el exón 8 puede causar altos niveles de los transcritos y de la expresión proteica del HLA-G. Mientras, el alelo HLA-G*010102 con el polimorfismo CAT en el codón 93 e inserción de

14bp en el exón 8 puede causar bajos niveles de transcritos HLA-G. Sin embargo, este efecto se atribuye en mayor medida al polimorfismo de las 14bp más que al codón 93.

2.- *Las cisteínas de los codones 101 y 164:* forman un puente disulfuro que está muy conservado en los genes del HLA tipo I. En el codón 101 puede ocurrir un cambio en una cisteína por un triptófano (TGC por TTC) o cambio de cisteína por serina (TGC por AGC) o cisteína por triptófano (TGC por TGG). Ambas mutaciones han sido encontradas en heterocigosis.

3.- *Codón 107:* ocurren varias sustituciones. Una de ellas es el cambio del codón GGA por CGA o AGA, con un cambio de glicina por arginina y afecta la unión del HLA-G al receptor TCR-CD8 de los linfocitos T.

4.- *Codón 110:* ocurre un cambio en la primera base del codón CTC por ATC, que provoca sustitución del aminoácido leucina por isoleucina. Este polimorfismo está muy conservado y no se afecta la estructura tridimensional, la polaridad del HLA-G ni las funciones de interacción con el sitio de unión al péptido o los receptores de los linfocitos T. El polimorfismo en el codón 110 origina el alelo HLA-G*0104 y es altamente secretor de HLA-G soluble en el suero materno.

5.- *Codón 130:* ocurre una delección de una citosina en la posición 1597 que origina el alelo nulo HLA-G*0105N. La delección del alelo puede generar un

codón stop en el codón 189 (GTG por TGA), en el exón 4, de manera que se crean isoformas incompletas o proteínas no truncadas y no hay secreción de la isoforma HLA-G1 o la soluble HLA-G5. En el caso de la isoforma HLA-G4, que no contiene el exón 4, dominio $\alpha 3$, puede originarse el codón stop en el codón 297 (GTA por TAG) en el exón 5, por lo que se bloquearía también su traducción.

Se sabe que la delección 1597C no afecta a otras isoformas unidas a membrana como las HLA-G2 y -G3 ni a las isoformas solubles HLA-G6 y -G7 ya que, por fraccionamiento alternativo, no tienen el exón 3, dominio $\alpha 2$, y no se ven afectadas por la delección ni por el corrimiento de aminoácidos. Estas isoformas truncadas son funcionales y pueden reemplazar en determinados aspectos a las isoformas completas del HLA-G. Pueden proteger del ataque de las células NK por interacción del dominio $\alpha 3$ con el receptor inhibitor ILT2 o por interacción del dominio $\alpha 1$ con el receptor inhibitor KIR2DL4 de las células NK.

Existe asociación entre la presencia de esta mutación y la falta de HLA-G soluble con los abortos recurrentes⁷⁸. El alelo HLA-G*0105N producido por este polimorfismo está asociado con la disminución de HLA-G1 y -G5 en suero, es decir, es un alelo bajo secretor de HLA-G y está relacionado con aumento del riesgo de abortos recurrentes.

- **Polimorfismos en el exón 4:** el exón 4 codifica para el dominio $\alpha 3$, el cual es constante debido a las funciones de interacción con la $\beta 2$ microglobulina, la

cual es importante para el mantenimiento de la conformación nativa de la molécula. El dominio $\alpha 3$ interacciona con los receptores inhibitorios LIR-1/ILT2 de las células NK, macrófagos y linfocitos T y B; y con los receptores LIR2/ILT4 de los monocitos y macrófagos.

A pesar de ser una zona muy funcional se han detectado cambios de bases que afectan al reconocimiento y unión del HLA-G al CD8 de los linfocitos T, generando nuevos alelos, como el caso del codón 258, con cambio de treonina por metionina y origina el alelo HLA-G*0105, o el polimorfismo en el codón 219, que cambia la arginina por triptófano y genera HLA-G*0108.

- ***Polimorfismos en el exón 8 (región 3'UTR):*** la región 3'UTR contiene varios elementos reguladores, incluyendo señales de poliadenilación que regulan la expresión temporal y espacial de ARNm. Existen 8 posibles polimorfismos en esta región y tienen que ver con la estabilidad de los transcritos del HLA-G. Pueden afectar la unión de determinadas proteínas al ARNm como el metabolismo, estabilidad, procesamiento, localización subcelular, control transnacional y patrón de fraccionamiento del transcrito.

Por ejemplo, el polimorfismo +3187 está relacionado con disminución de la estabilidad de la molécula, mayor degradación del ARNm y se asocia con preclampsia por disminución de los niveles de HLA-G. Los polimorfismos T1570C y C1594A están asociados con abortos de repetición cuando se asocian al polimorfismo 14bp INDEL ya que ambas regiones están en

desequilibrio de enlace. También se ha visto que existe un elevado desequilibrio entre el polimorfismo 14bp INDEL y los alelos +3142G y +3187A¹⁹⁵.

VIII.8 DETERMINACION DEL POLIMORFISMO 14bp DELECIÓN/INSERCIÓN Y SU RELACION CON LOS ALELOS HLA-G

Las asociaciones no aleatorias entre los polimorfismos en locus diferentes o dentro del mismo locus se miden por el grado de desequilibrio de enlace (DE). Existe un elevado desequilibrio de enlace dentro de la región HLA-G. Es casi imposible la asociación de un determinado SNP con el aborto de repetición pero, sin embargo, si es posible la asociación de un determinado haplotipo del HLA-G con pérdidas gestacionales recurrentes, y por eso se estudian algunos polimorfismos en conjunto, como el caso de la región 5' con 14bp INDEL en la región 3'.

El polimorfismo HLA-G más estudiado y con más implicaciones funcionales es la inserción/delección de 14 pares de bases (INDEL 14bp) (5' ATTTGTTTCATGCCT 3') en el extremo 3' URT del exón 8. Fue detectado por primera vez en 1993. Los estudios sobre HLA-G en primates contienen la inserción de las 14bp, por esto se piensa que el polimorfismo verdadero es la delección más que la inserción. Incluso se sugiere que dos polimorfismos en las posiciones +3742 y +3743 del exón 8 pueden ser considerados como los precursores de la aparición de la delección 14bp en el gen del HLA-G

Esta variante génica se ha asociado con diferentes situaciones relacionadas con la estabilidad del HLA-G y los niveles de ARNm. La inserción 14bp produce transcritos menos estables y menos ARNm de HLA-G soluble y unido a la membrana en las poblaciones celulares del trofoblasto, alterando los patrones de fraccionamiento alternativo.

La inserción 14bp se acompaña de los polimorfismos +3142G y +3187A, ambos asociados con bajos niveles de ARNm. Por otro lado, los polimorfismos en la región 3' UTR pueden influenciar los niveles de expresión de HLA-G soluble en suero. La inserción homocigota +/-14bp puede afectar la regulación transcripcional del HLA-G, disminuyendo la cantidad y estabilidad del ARNm y una disminución significativa de los niveles de HLA-G plasmáticos en comparación con los genotipos heterocigotos.

Se ha detectado que los mayores niveles de HLA-G soluble se presentan en los heterocigotos (+/- 14bp) comparados con los homocigotos para la delección o la inserción. Las delecciones en el extremo 3' de 14bp son asignadas a los alelos HLA-G*010101, G*0102 y G*010401 y son altos secretores de HLA-G soluble en plasma. Las inserciones 14bp son asignadas a los alelos HLA-G*01012, HLA-G*01013, HLA-G*0103, HLA-G*0105N y HLA-G*0106 y por lo tanto, serán alelos bajos secretores de HLA-G en plasma. Existe asociación significativa entre el alelo HLA-G*0106 y el polimorfismo en heterocigosis +/- 14bp con las placentas de pacientes con preeclampsia y abortos recurrentes.

La inserción +/-14bp en homocigosis es mayor en mujeres con pérdidas gestacionales recurrentes, debido a la disminución de los niveles de HLA-G secretor por ser alelo bajo secretor. Además, existe un fuerte desequilibrio de enlace entre el polimorfismo 14bp INDEL y el alelo HLA-DR3, un alelo de clase II que es más frecuente en mujeres con abortos de repetición.

Los bajos niveles de HLA-G soluble en plasma en el suero de las mujeres embarazadas están relacionados con complicaciones en el embarazo como preeclampsia, retardo del crecimiento intrauterino y aborto recurrente⁷⁸. Si embargo, con respecto a los niveles de expresión de HLA-G en las placentas a término, no se encuentra ninguna asociación entre los niveles de HLA-G y los diferentes genotipos del polimorfismo 14bp INDEL.

Además, los polimorfismos 14bp están relacionados con otras patologías como la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico, las cardiomiopatías y el pénfigo vulgar. Incluso han sido estudiados en caso de trasplantes donde los genotipos homocigotos para la inserción 14bp (asociados con bajos niveles de HLA-G soluble) tienen más probabilidades de rechazo que los genotipos homocigotos para la delección asociados con el éxito del trasplante.

VIII.9 HLA-G Y GESTACION

Las células del trofoblasto humano son únicas en comparación con otros tejidos somáticos, ya que no expresan HLA-A y B y sólo expresan HLA-G. Por lo tanto, el HLA-G cumple un papel crucial en la tolerancia inmunitaria feto-

materna, dado que se expresa desde los primeros días siguientes a la fecundación. La expresión del HLA-G en el trofoblasto durante la gestación sugiere un rol en la protección del feto semialogénico contra la lisis de las células NK maternas y la respuesta de los linfocitos T alo-citotóxicos. Es un componente crítico del trofoblasto y su capacidad invasiva.

Tanto el ARN-m como sus isoformas se expresan en gestaciones molares y embarazos ectópicos. Este patrón de expresión no es afectado por la composición cromosómica del feto, y ello sugiere que el HLA-G es independiente del desarrollo embrionario²⁰⁶.

La expresión de una molécula clase I no clásica es correlacionada con la resistencia de las células NK. Estas células están íntimamente relacionadas con las células del trofoblasto que invaden el útero. La expresión de antígenos HLA clase I, G y C, por estas células del trofoblasto incrementan la posibilidad que las células NK maternas puedan reconocer y responder a las células fetales trofoblásticas. Así, la interacción materno-fetal, y por ende el éxito del proceso reproductivo, podría depender de un sistema aloinmune de reconocimiento de NK.

El HLA-G es identificado en macrófagos aislados de la placenta. El tratamiento de estas células con INF γ incrementa los niveles de HLA-G en la superficie celular y la expresión intracelular²⁰⁷, influyendo en el repertorio de péptidos

extraños presentados a la madre durante la placentación y también durante condiciones autoinmunes inflamatorias en la madre.

VIII.10 HLA-G Y PATOLOGIA OBSTETRICA

El HLA-G cumple un importante papel en el mantenimiento de la unidad feto-placentaria. Los niveles plasmáticos de HLA-G no cambian sustancialmente durante el curso normal del embarazo. Parece que las formas solubles producidas en las células trofoblásticas de la placenta llegan a la sangre materna y una parte de ellas es producida por las células competentes de la madre.

Una alteración en la regulación de esta molécula se traduce en complicaciones de la gestación como *preeclampsia*, *abortos de repetición*, *fallos de implantación*, *amenaza de parto pretérmino* y *desprendimientos de placenta*.

VIII.10.1 PREECLAMPSIA:

Es una patología obstétrica multifactorial que se desarrolla a partir de las 20 semanas y afecta el 2-7% de todos los embarazos. La triada clásica es hipertensión arterial, proteinuria y edemas, y presenta una alta morbimortalidad materna y fetal en las formas severas.

El factor de inicio de la preeclampsia es la reducción de la perfusión uteroplacentaria secundaria a una anomalía en la invasión de las arteriolas espirales uterinas por las células citotrofoblásticas extravelosas (defecto en la

placentación), asociada a alteraciones locales del tono vascular, balance inmunológico y estado inflamatorio, a veces con predisposición genética.

El endometrio decidualizado secreta $TGF\alpha$ e inhibidores de metaloproteasas. Las células T, macrófagos y NK segregan citoquinas, VEGF, FGF, PDGF, $TNF\alpha$, IL-1 y IL-6, responsables de la neoangiogénesis y la invasión trofoblástica normal.

La molécula HLA-G ayuda en los procesos de invasión del trofoblasto. En la preeclampsia se presentan patrones de expresión alterados del HLA-G y una baja invasión trofoblástica, con inadecuada remodelación de los vasos sanguíneos uterinos, originando hipoxia, aumento de peroxidación lipídica, vasoconstricción, agregación de plaquetas, trombosis y depósitos de fibrina, desencadenando baja perfusión con insuficiencia placentaria y RCIU fetal. Hay aumento de las resistencias vasculares periféricas e inicio de hipertensión arterial²⁰⁸.

Se produce activación inmune generalizada, con cambio de respuesta proinflamatoria TH1 (células T CD4+ que secretan IL-2 e IFN γ), se altera la regulación de la apoptosis en el trofoblasto extraveloso e inhibición excesiva de las NK uterinas, con menor expresión del HLA-G placentario, menor secreción de esta proteína a la circulación materna y menos formas solubles en el suero materno²⁰⁹.

Esta disminución en la expresión del HLA-G placentario ocurre por una diferenciación aberrante en el trofoblasto debido a mutaciones genéticas de ese gen. Se han reportado un grupo de polimorfismos genéticos maternos que predisponen a la preeclampsia ya que altera la expresión génica. El más estudiado es el polimorfismo 14-bp (ubicado en la región 3'UTR del gen HLA-G) y su relación a complicaciones de la gestación como la preeclampsia, abortos de repetición y fallos de técnicas de fecundación in vitro²¹⁰. Hay que profundizar en el papel que cumple esta molécula en la fisiopatología de esta enfermedad.

VIII.10.2 ABORTOS DE REPETICIÓN

Los abortos de repetición se definen como la pérdida de dos o más gestaciones consecutivas antes de la semana 20. Ocurre en el 2-5% de mujeres en edad fértil. Es de origen multifactorial, siendo las causas genéticas las más frecuentes.

Un fallo en los mecanismos que protegen al embrión del sistema inmune desencadena un aborto espontáneo. La expresión del HLA-G en el trofoblasto, sugiere un rol en la protección del feto semialogénico contra la lisis de las NK maternas y la respuesta de los linfocitos T alo-citotóxicos.

Los niveles de HLA-G solubles disminuyen en las muestras de suero de pacientes con pérdidas gestacionales recurrentes con respecto a las gestaciones de curso normal, por un patrón de expresión alterado²¹¹. Existe un

mayor nivel de FAS soluble en el suero, que bloquearía el FAS-L de la placenta y anularía la apoptosis de linfocitos T activados contra antígenos fetales. Se producen respuestas TH1, con mayores niveles de INF γ y menores de IL-10, IL-4 y LIF.

Aunque la función de las diferentes isoformas HLA-G en la gestación no se conocen, se sabe que el HLA-G1 cumple un papel importante en la unidad feto-placentaria en el inicio del embarazo, y se encuentra disminuida en pacientes con abortos de repetición²¹².

Tanto el ARNm como las isoformas del HLA-G se expresan en embarazos ectópicos y molas hidatidiformes. Este patrón no es afectado por la composición cromosómica del feto, y ello sugiere que la expresión del HLA-G es independiente del desarrollo embrionario.

Existe relación entre determinados polimorfismos HLA-G en los abortos de repetición. Existe un aumento en la frecuencia de los alelos HLA-G*01013 y HLA-G*0105N y la expresión del polimorfismo 14-bp en pérdidas gestacionales recurrentes²¹³.

VIII.10.3 FALLOS DE IMPLANTACIÓN.

La detección de formas solubles de HLA-G en los medios de cultivo embrionario se asocia con un mayor éxito en los tratamientos de fecundación in

vitro. Esta forma soluble proviene del líquido folicular, se adhiere a los ovocitos y se libera a los cultivos en el laboratorio²¹⁴.

La expresión de la transcripción del HLA-G se asoció con una tasa de división celular mayor cuando se compara con embriones carentes de HLA-G ARNm, y la tasa de recién nacido vivos en las mujeres con embriones HLA-G positivo fue significativamente mayor que en HLA-G negativos²¹⁵.

Es necesario realizar más líneas de investigación en este campo de la fertilidad⁹³. Independientemente del origen del HLA-G, el potencial clínico para mejorar el tratamiento de FIV y la reducción de gestaciones múltiples es muy prometedor.

VIII.10.4 AMENAZA DE PARTO PRETERMINO.

Ocurre por infecciones (endotoxinas bacterianas, lipopolisacáridos de bacterias gram negativas) que activan los mecanismos de inflamación TH1 y macrófagos, y pueden desencadenar el trabajo de parto.

Además, el HLA-G soluble disminuye a medida que avanza la gestación²¹⁶. Los niveles de isoformas solubles son significativamente más altos en sueros de pacientes con amenaza de parto pretérmino. Esto plantea que los cambios en la concentración de HLA-G soluble participan en el mantenimiento de la homeostasis del tracto reproductivo.

VIII. 8.5 DESPRENDIMIENTOS DE PLACENTA

Durante el tercer trimestre, las concentraciones de HLA-G soluble en mujeres con desprendimientos de placenta son tres veces menores que en la gestación normal²¹⁷.

XI. GENERALIDADES SOBRE CÉLULAS MADRE.

Las células madre son precursores inmaduros o indiferenciados que tienen la capacidad de autorrenovarse por divisiones mitóticas o continuar la vía de diferenciación y producir células en tejidos maduros y funcionales según el grado de multipotencialidad²¹⁸. Se clasifican según su capacidad de diferenciación y el origen de su obtención.

Existen cuatro tipos de células madre:

- *Totipotentes*: puede dar lugar a todo tipo de células del organismo, tanto los componentes embrionarios (3 capas embrionarias, el linaje germinal y el saco vitelino), como los extraembrionarios (placenta).
- *Pluripotentes*: no pueden originar un organismo completo, pero sí otro tipo de célula correspondiente a los tres linajes embrionarios (endodermo, ectodermo, mesodermo) y el saco vitelino.
- *Multipotentes*: solo pueden generar células de su misma capa o linaje de origen embrionario (una célula madre mesenquimal, al tener naturaleza mesodérmica, origina miocitos, adipositos y osteocitos).
- *Unipotentes*: originan únicamente un tipo de célula.

Los tipos de trasplante según la fuente de progenitores son:

- *Médula ósea*: es la fuente original de las células progenitoras hematopoyéticas, pero su utilización está disminuyendo al ser sustituida por la obtención de progenitores de sangre de cordón umbilical.
- *Sangre periférica*: en condiciones normales existe una mínima cantidad de células madre hematopoyéticas circulantes que aumenta en la fase de administración de factores de crecimiento. Luego se somete a sesiones de aféresis para obtener la fracción de células madre CD34+. Su ventaja es que la recuperación es más rápida que en la médula ósea, pero los linfocitos T del donante en la sangre periférica pueden incrementar el riesgo de enfermedad injerto contra huésped.
- *Cordón umbilical*: las células progenitoras hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical se utilizan para trasplantes alogénicos de donantes no emparentados. Su volumen es limitado, lo que hace que el número total de células madre es pequeño y la recuperación inmunohematológica lenta.
- *Embrionarias*: forman parte de la masa celular interna del blastocisto. Son pluripotentes, indiferenciadas y tienen la capacidad de dividirse indefinidamente sin perder las propiedades.

IX.1 VENTAJAS DE CELULAS MADRE DEL CORDON UMBILICAL.

La presencia de progenitores hematopoyéticos en sangre de cordón umbilical se demostró por primera vez en 1974. Son más inmaduros y primitivos con respecto a los progenitores de la médula ósea. Una gran cantidad de células madre circulan en sangre fetal y materna, por lo que su obtención en el momento del parto es fácil y segura.

El porcentaje de células madre hematopoyéticas CD34+ en sangre de cordón decrece de acuerdo a la edad gestacional. A las 20 semanas, las células madre comprenden el 11% de todas las células mononucleadas, mientras que en la semana 38 corresponden al 1%. A pesar del pequeño volumen, su concentración es suficiente para permitir la reconstitución hematopoyética por medio de un trasplante²¹⁹.

Las ventajas de utilizar los precursores hematopoyéticos de la sangre de cordón como fuente alternativa para su uso terapéutico son:

- ✓ Facilidad en la obtención de los mismos.
- ✓ Ausencia de riesgo por procedimientos (aspirado de médula ósea o aféresis) para el donante.
- ✓ Pronta disponibilidad de las células madre criopreservadas.
- ✓ Baja incidencia en la enfermedad de injerto contra huésped.
- ✓ Plasticidad celular.

- ✓ Bajo coste del procedimiento.
- ✓ Disponibilidad en bancos públicos y privados de sangre de cordón umbilical.

Tienen como desventaja la menor cantidad de células obtenidas de esta fuente comparada con la médula ósea. Se desarrollan protocolos que permitan la expansión de los precursores in vitro para beneficiarse de un mayor número de células obtenidas para el injerto. El principal uso actual de los progenitores hematopoyéticos de sangre de cordón umbilical es el "trasplante de médula ósea" para sustituir el sistema hematopoyético enfermo por uno funcional.

X. CARACTERIZACION DE LAS CELULAS HEMATOPOYETICAS DEL CORDON UMBILICAL

X.1 CELULAS MADRE

Las células madre hematopoyéticas CD34+ aisladas de cordón umbilical se utilizan como una fuente alternativa de células progenitoras hematopoyéticas para el trasplante alogénico usando CD34+ como marcador. Sin embargo, la molécula recientemente descrita como CD133+ parece caracterizar progenitores hematopoyéticos más inmaduros o primitivos²²⁰.

CD133+ es una glicoproteína con cinco dominios transmembrana que se co-expresa principalmente con CD34+ pero que también se expresa en células

CD34-/CD38- y que son capaces de dar lugar a células CD34+ *in vitro*. Por otra parte, CD133+ podría ser una alternativa a CD34+ respecto a la selección de células madre humanas y a su expansión *ex vivo*²²¹.

La expresión de CD133+ se ha demostrado en epitelio indiferenciado, retinoblastoma, teratocarcinoma, leucemias y células madre neuronales de cerebro fetal. Además, las células progenitoras CD133 pueden generar *in vitro* células endoteliales, células progenitores de megacariocitos, células con fenotipos neuronales después del tratamiento con ácido retinoico y células del linaje mielo-monocítico²²².

Se han definido tres grupos principales de células madre hematopoyéticas dependiendo de la presencia o ausencia de estos marcadores (CD34+/CD133-; CD34+/CD133+ y CD34-/CD133+)²²³. La mayoría de las células madre CD34+ son CD133+ y sólo existe un pequeño porcentaje de los otros dos grupos. Datos recientes del potencial proliferativo de las células CD133+/CD34+ en sangre periférica indican que el 70% de las colonias derivaron en granulocitos-monocitos, mientras que más del 90% de las colonias que se generaron a partir de la fracción CD133-/CD34+ fueron colonias eritrocitarias. Además, las células adherentes CD34- derivadas de suspensiones enriquecidas en células CD133+ eran capaces de crear supervivencias a largo plazo de injertos de ratones NOD/SCID (“nonobese diabetic/ severe combined immunodeficient mice”) que con células CD34+²²⁴.

Se ha observado *in vivo* que si el parámetro de selección es CD133+ y no CD34+, la evolución del injerto del trasplante es más favorable suponiendo que es debido a su mayor grado de inmadurez²²⁵. Además, si el injerto es de células CD133+ de sangre periférica, la compatibilidad HLA puede ser menor sin perjuicio de producirse la enfermedad injerto contra huésped, por lo que las células trasplantadas de cordón tiene que tener características diferenciales respecto de las de médula o periféricas²²⁶. Este marcador también se ha encontrado en células neoplásicas de tumoraciones en el cerebro y ciertos tipos de carcinoma de riñón²²⁷.

X.2 CELULAS DENDRITICAS

Las células dendríticas son las células presentadoras de antígeno más potentes que existen, con capacidad de inducir una respuesta inmune primaria²²⁸. Constituyen una población heterogénea de células hematopoyéticas con dos tipos fundamentalmente: ***células dendríticas mieloides (CD11c+)*** y ***células dendríticas plasmacitoides (CD11c-)***.

Estos dos subtipos derivan de la célula madre “stem cell” CD34+ con dos patrones de diferenciación. Las células mieloides provienen del precursor de la médula ósea y cordón umbilical que da origen a los monocitos y macrófagos por medio de citoquinas como GM-CSF y TNFα. Migran a los tejidos periféricos donde se diferencian en células de langerhans o intersticiales y permanecen en

forma inmadura hasta que un estímulo antigénico induce su migración a órganos linfoides secundarios²²⁹.

Las células dendríticas plasmacitoides están presentes en sangre periférica, tejido linfoides secundario y timo. Expresan marcadores de superficie CD123+, DR+/CD4+ bajo, CD45RA+, IL3RALFA+, CD303+ y CD304+. No expresan ni CD11C+ ni CD14+, lo que las distingue de las células dendríticas convencionales y los monocitos²³⁰. Al ser estimuladas, producen IFN α e INF β . Participan en la selección negativa tímica de los linfocitos T autorreactivos.

Estas subpoblaciones pueden ser diferenciadas mediante la utilización de marcadores de superficie y existen protocolos para obtener diferentes tipos de células dendríticas in vitro a partir de células madre CD34+ y células periféricas CD14+. Se encargan de la inducción de la tolerancia inmune o activación linfocitaria²³¹.

Las células dendríticas inmaduras se diferencian de las maduras por sus características fenotípicas. Las inmaduras presentan altos niveles de CD32 y receptores tipo leptina, y bajos niveles de CD40, CD54, CD80, CD86, y moléculas HLA clase I y II.

Las células dendríticas maduras se caracterizan por baja expresión de CD32 y alta densidad de CD80, CD86, CD54, CD40 y moléculas HLA clase I y II. Estos cambios fenotípicos permiten modificar sus propiedades funcionales. Existen anticuerpos monoclonales dirigidos a marcadores específicos, los cuales se

llaman BDCA (blood dendritic cell antigen). Permiten detectar subpoblaciones de células dendríticas mieloides (BDCA-1 y BDCA-3) y células dendríticas plasmacitoides (BDCA-2 y BDCA-4)²³².

Las células dendríticas son capaces de dirigir la diferenciación de los linfocitos T en respuestas TH1 o TH2 dependiendo del tipo de citoquina que produce. Si la célula dendrítica mioide está en un ambiente donde predomina IL-12, la respuesta es TH1, y si la célula plasmacitoide está en un ambiente rico en IL-4, IL-5, IL-9 o IL-13, la respuesta es TH2. Además existe una regulación recíproca: el INF α promueve una respuesta TH2 por inhibición de la producción de IL-12, en cambio IL-4 induce apoptosis de las dendríticas linfoides y respuesta TH1.

La presentación antigénica ocurre cuando un fragmento del antígeno peptídico asociado con moléculas HLA clase II en la membrana de la célula dendrítica se pone en contacto con el linfocito T CD4⁺ virgen a través del receptor TCR. Esta evidencia ha permitido plantear el uso de las células dendríticas para inducir inmunidad protectora frente a patógenos y tumores. Además, la célula dendrítica presenta antígenos glucolípidos de manera directa a los linfocitos T CD8⁺ y NK a través de otras moléculas del HLA denominadas CD1 (a, b, c, d, e).

HIPOTESIS

HIPOTESIS DEL TRABAJO

Existen mecanismos biológicos de regulación de la respuesta inmune que se concretan en la relación materno-fetal cuyas características empíricas son: 1.- baja incidencia de la enfermedad injerto contra huésped (GVHD) en el trasplante de sangre de cordón umbilical incluso con baja compatibilidad HLA respecto al de médula ósea o de precursores de sangre periférica, 2.- Alto grado de inmadurez de las células dendríticas (DC) en la sangre de cordón umbilical, 3.- El posible papel de los antígenos no clásicos HLA-G, -E y -F en la tolerancia materno fetal así como su actividad de inhibición de células NK y 4.- La expresión de CD1d en las células dendríticas como regulador de activación e inhibición del sistema inmune vía células NK.

Por otra parte, si consideramos el trasplante de células madre en caso de leucemias, linfomas, inmunodeficiencias de donantes alogénicos (no relacionados), éstas tienen la capacidad de sobrevivir indefinidamente en el organismo receptor y regenerar todo el sistema inmune que en caso de menor compatibilidad HLA en la sangre de cordón umbilical se produce una menor incidencia de enfermedad injerto contra huésped por lo que tienen que tener mecanismos de inhibición para no ser destruidas.

Dentro de esta relación materno-fetal existen otros mecanismos de regulación presente en los eritrocitos fetales que aparecen en el torrente sanguíneo materno a partir de la octava semana de embarazo con características muy

especiales. 1.- Son nucleadas, 2.- No son destruidas por el sistema inmune de la madre incluso con hasta un 50% de incompatibilidad, y 3.- Sobreviven durante el embarazo. Cabe pensar que existe algún mecanismo de tolerización de las mismas. Por lo tanto, pasamos a realizar la caracterización de las células madre hematopoyéticas CD34 y células dendríticas mieloides y plasmacitoides de sangre de cordón umbilical y de sangre periférica respecto a la expresión de proteína HLA-G, -E, -F de superficie e intracelular y su expresión génica por la presencia de transcritos (mRNA) de estas proteínas y en el caso de HLA-G de la aparición de las distintas isoformas en las distintas poblaciones celulares. También se testó la presencia de CD1d en las células madre y la variación de expresión de la sangre de cordón umbilical (SCU) y en sangre periférica del adulto (SPA).

OBJETIVOS

OBJETIVOS DEL TRABAJO:

PRINCIPAL

- Determinar la presencia de la proteína HLA-G en la superficie celular de células madre CD34/CD133, células dendríticas mieloides y plasmacitoides, células dendríticas derivadas de células CD34/CD133 y derivadas de monocitos de sangre de cordón umbilical y sangre periférica materna, por técnicas de citometría de flujo y la expresión de la proteína HLA-G soluble en plasma de sangre de cordón umbilical por técnicas de ELISA.

SECUNDARIOS

- 1.- Realización de cultivos celulares de diferenciación para la transformación “in vitro” de células madre hematopoyéticas y monocitos de sangre de cordón umbilical en células dendríticas y ver sus características inmunofenotípicas.
- 2.- Estudiar el ARN-m de HLA-G en poblaciones celulares de sangre de cordón umbilical y detectar el patrón de expresión de los transcritos alternativos de HLA-G (HLA-G1 a G7) en células dendríticas mieloides, plasmacitoides y células dendríticas derivadas de células madre y células madre hematopoyéticas por RT-PCR (retrotranscripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa) y secuenciación de ADN.

- 3.- Describir nuevos alelos de HLA-G y su correlación con la expresión génica.
- 4.- Estudiar la relación de los polimorfismos 14bp inserción/delección con los alelos HLA-G.
- 5.- Estudiar la expresión de los marcadores CD1a y CD1d en las distintas poblaciones celulares de las células madre del cordón umbilical.
- 6.- Determinar la función potencial de interacción HLA-G que permita incluir nuevos enfoques terapéuticos en la inmunoterapia del trasplante, tumores y la gestación.

PACIENTES

I. PERIODO DE ESTUDIO

Este trabajo ha sido realizado durante el periodo de tiempo comprendido entre 2008-2012, con apoyo multidisciplinario entre el Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Clínico Universitario San Carlos de Madrid y la Unidad de Inmunoterapia Celular del Instituto de Salud Carlos III de Madrid.

II. POBLACION DE ESTUDIO

Se obtuvo un total de 35 unidades de sangre de cordón umbilical, 35 unidades de sangre periférica de adulto y 35 muestras de sangre de gestantes a término (más de 37 semanas), que acudieron al Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Clínico Universitario San Carlos con cesáreas programadas. Los controles sanos no relacionados sirvieron para la extracción de sangre periférica de adulto para la comparación de las células hematopoyéticas con el cordón umbilical.

II.1 CRITERIOS DE INCLUSION DE LA POBLACION

Los criterios de inclusión fueron:

- Gestaciones de curso normal.
- Controles periódicos en la Unidad de Obstetricia del Hospital Clínico San Carlos.
- Serologías negativas (VHB, VHC, HIV, sífilis, toxoplasmosis y rubéola).
- Sin patologías maternas (diabetes gestacional, hipertensión arterial, enfermedades reumatológicas).

II.2. CRITERIOS DE EXCLUSION DE LA POBLACION

Los criterios de exclusión de recogida de sangre de cordón umbilical para la obtención de células hematopoyéticas fueron:

- Prematuridad.
- Gestación gemelar.
- Circular de cordón no reducible.
- Fiebre materna intraparto.
- Hipertensión arterial materna.
- Hemorragia materna.
- Enfermedad infectocontagiosa activa.
- Adictas a drogas vía parenteral.
- Signos de aspiración de meconio.
- Ruptura prematura de membranas de más de 12 horas.
- Signos biofísicos de sospecha de sufrimiento fetal intraparto.

Desde la consulta de obstetricia se explica a las pacientes el protocolo del trabajo. Se les proporciona dos consentimientos informados aprobados por los Comités de Bioética del Hospital Clínico San Carlos y del Instituto de Salud Carlos III, uno de ellos relativo a la donación de sangre periférica materna (Anexo 1) y el otro de sangre de cordón umbilical con fines de investigación, la cual es confidencial y tratada mediante codificación (Anexo 2). Ambos consentimientos se archivan en la historia clínica de la paciente (Anexo 3 y 4).

MÉTODOS

I. METODOLOGIA CLINICA:

I.1 TECNICA DE EXTRACCION Y RECOGIDA DE SANGRE DE CORDON UMBILICAL.

El Real Decreto 1301/2006 del 10 de noviembre del 2006 establece las normas de calidad y seguridad para la donación, obtención, evaluación, procesamiento, preservación, almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos, incluidas las células de la placenta procedentes de sangre de cordón umbilical.

Cuando la gestante a termino acude a la monitorización fetal anteparto, en el paritorio, previa a la cesárea, se le realiza la extracción sanguínea periférica con 2 tubos tapa color malva, previo consentimiento informado debidamente firmado y cumplimentado.

La extracción y recogida de la sangre de cordón umbilical se realizó una vez nacido el recién nacido sin que se haya producido el alumbramiento de la placenta. Se limpia con solución antiséptica una porción del cordón lo más distal posible a su inserción placentaria. Se obtiene una muestra para pH (valorar bienestar fetal) y a continuación se efectuará la punción de la vena umbilical con la aguja estéril de la bolsa de donación.

La sangre se recoge permitiendo que caiga por gravedad y mezclándola regularmente con los 20 ml de anticoagulante de la bolsa (dextrosa citrato

coagulante). Se obtiene un volumen medio de 150 ml. Finalmente se procede al cierre, revisión del etiquetado y almacenamiento provisional de la bolsa hasta su recogida, codificándola en la hoja de recogida de datos.

La sangre de cordón umbilical se mantiene provisionalmente un máximo de 24-48 horas antes de su procesamiento a temperatura ambiental. Se transporta en un contenedor isotérmico hasta el laboratorio del Instituto de Salud Carlos III.

I.2 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

En el laboratorio se procede a cuantificar en ml la cantidad obtenida de sangre de cordón umbilical y se aplica el Protocolo de procesamiento de muestras de cordón umbilical.

➤ PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE SANGRE DE CORDÓN

Material:

- ❖ Bolsa de extracción para sangre de cordón umbilical (150 ml-CPD, grifols).
- ❖ Columna o pie para extracción por gravedad.
- ❖ Recogida en esterilidad (paritorios).

Metodología:

- La bolsa de extracción condiciona el tipo de recogida.
- Antes del alumbramiento de la placenta, se procede a la extracción de sangre de cordón umbilical por gravedad.
- En el tipo de bolsa utilizada existen dos agujas de extracción, para este caso se utilizará una de ellas. La no utilizada se cierra a nivel de la

bifurcación para no perder vacío. La otra se clampa al nivel que sea accesible la aguja. Debe quedar abierto el clampaje del tubo común a ambas agujas.

- Se procede a la canalización de una de las venas principales en el punto más distante del cordón respecto a la placenta.
- Una vez canalizado se desclampa la aguja seleccionada dejando fluir la sangre. Si es posible mantener la bolsa en agitación para evitar coágulos.
- Terminada la extracción se realiza el clampaje de la aguja utilizada.
- Se cierra la bolsa al nivel del borde de la misma y se da un leve masaje para la homogeneización de la misma.
- Una vez en el laboratorio y en campana de flujo laminar se procede a su extracción mediante una jeringa de 10 o 20 ml y se transvasa a tubos tipo falcón de 50 ml estériles.
- Dichos tubos se centrifugarán a 2500 r.p.m 5 min. para la separación del plasma que se recoge mediante pipeta pasteur estéril y se pasa a los tubos correspondientes para su congelación a -20°C y posterior uso futuro.
- El restante del tubo se diluirá 1:1 con medio PBS y se homogeneiza para el paso posterior de aislamiento de células mononucleares.

I.3 ESTUDIOS CELULARES

I.3.1 EXTRACCION DE SUBPOBLACIONES

I.3.1.1 GRADIENTE DE DENSIDAD

El **Gradiente de Densidad** (gradiente de ficoll) es la propiedad celular más utilizada para separar diferentes poblaciones celulares de sangre de cordón umbilical y sangre periférica. El **Ficoll** es un polímero de sacarosa de alto peso

molecular que permite aislar células mononucleares del resto de las poblaciones celulares sanguíneas (polimorfonucleares y hematíes).

Las fracciones de células mononucleares se aíslan usando “*Lympholyte*” (Cedarlane, Ontario, Canadá), por centrifugación de gradiente de densidad y tecnología de microbeads MACs correspondiente (Miltenyi Bistec, Bergisch Gladbach, German). Las células dendríticas mieloides y plasmacitoides y las hematopoyéticas CD34+ se obtienen usando los Kits correspondientes de los marcadores de diferenciación celular.

Los Kits de CD3 y CD19 se usan para aislar células T y células B según las instrucciones de los fabricantes, conjugados con microesferas magnéticas (Miltenyi Biotech; Bergisch Gladbach, Alemania).

➤ PROTOCOLO DE AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES

Material:

- ❖ Gradiente de densidad Lympholyte (Cedarlane, Ontario, Canadá).
- ❖ Medio comercial de cultivo RPMI 1640 o PBS pH: 7.2.
- ❖ Antibióticos: Nuvapen (2500 mg), Orbenin (2500 mg) y Gentamicina (800mg), se disuelve hasta un volumen final de 200ml.
- ❖ Suero de ternera fetal (FCS): una botella de 500ml, una hora a 56°C. A continuación se alícuota en frascos de 10 ml.
- ❖ Todo el proceso se realiza en condiciones de esterilidad.

Procedimiento:

- Poner en un tubo de 14 ml, 5 ml de lympholyte.

- Añadir 7 ml de sangre diluida con ayuda de la pipeta pasteur sobre el Lympholyte. Se realizará despacio contra las paredes interiores del tubo y teniendo cuidado para que no tenga lugar la mezcla de ambas fases.
- Una vez añadida la sangre, centrifugar durante 40 minutos a 1800 r.p.m. Con esta operación se consigue que, gracias al gradiente de densidad creado por el Lympholyte, los eritrocitos se agrupen y sedimenten, los polimorfonucleares queden en la interfase entre eritrocitos y lympholyte y las células blancas mononucleares permanezcan en la interfase entre el Lympholyte y el medio de dilución.
- Una vez retirados los tubos de la centrífuga, observaremos una nube difusa en la interfase entre el Lympholyte y el medio de dilución que corresponde a las células mononucleares. Retirar esta nube con una pipeta pasteur y realizar movimientos circulares (procurar arrastrar el medio y no el Lympholyte). Depositamos los linfocitos en otro tubo limpio y estéril.
- Realizar dos lavados con medio RPMI suplementado con 1% de antibiótico o PBS y centrifugar en ambas ocasiones durante 10 minutos a 1200 r.p.m. Cada lavado consiste en añadir sobre las células mononucleares el medio hasta completar el tubo (10-12 ml), mezclar suavemente y centrifugar 10 min. a 1200 r.p.m. Posteriormente se retira el sobrenadante volcando el tubo, quedando los células mononucleares en el fondo del mismo formando un pellet. Antes de añadir de nuevo medio disociar el pellet golpeando suavemente con los dedos el fondo del tubo.

➤ RECuento, Viabilidad y Pureza de la Muestra

Material:

- ❖ Preparación de eosina. Se disuelven 5 g de Eosina en 95 ml de agua bidestilada. A continuación se filtrará por una gasa estéril.

- ❖ Preparación de azul tripán: Se preparará una solución de azul tripán al 0.4% en PBS.

Procedimiento:

- **Recuento de células y ajuste de la concentración celular:** Para el recuento de células se necesita una cámara de conteo o hemocitómetro. Las cámaras de Neubauer tienen diferentes cuadros grandes compuestos cada uno de ellos de 16 cuadros pequeños. Cada uno de estos cuadros grandes tiene una capacidad de 0.1 mm^3 lo que equivale a 10^{-4} ml .

Con ello podremos calcular la concentración celular. A efectos prácticos la concentración celular por ml será igual al número de células contadas en 16 cuadros de la cámara $\times 10^6/100$. Si queremos saber el número total de células de la suspensión bastará con multiplicar por el número de ml. Para ajustar la suspensión celular a la concentración deseada se aplica la fórmula: $V \times C = V' \times C'$ de manera que $V' = V \times C/C'$ donde V es el volumen en el que tenemos la muestra (se considera 1 porque habremos centrifugado y tendremos el pellet celular. Si no es así y tenemos la suspensión en un volumen determinado, será este volumen) C es la concentración de células en la suspensión celular. V' es el volumen de líquido en el que tenemos que resuspender la muestra para que quede a $3.5 \times 10^6 \text{ ml}$ y C' es la concentración final a la que se desea tener las células.

- **Determinación del porcentaje de células mononucleares.** La solución comercial de Lymphoprep asegura una muestra libre de polimorfonucleares.
- **Determinación de la viabilidad celular de la muestra.** Se toma una muestra (aproximadamente 10 ml) de la suspensión celular obtenida en la interfase Lymphoprep/plasma después de tres lavados con RPMI y se

diluye 1:1 en eosina o solución de azul tripán. Se observa al microscopio de modo que las células vivas se verán claras y refringentes y las células muertas se verán rojo-oscuro o azul oscuro y no refringentes.

- **Determinar el porcentaje de células viables.** Para que los resultados sean interpretables la muestra debe tener una viabilidad superior al 90%.

La viabilidad puede encontrarse disminuida en:

- ✓ Cordones extraídos con cierto tiempo de antelación a la extracción de la sangre.
- ✓ Muestras extraídas mucho tiempo antes de ser procesadas.
- ✓ Muestras que han sido almacenadas de manera inadecuada (muestras de sangre entera refrigeradas o sometidas a temperaturas extremas).
- ✓ Si ha ocurrido algún accidente durante el manejo o el procesamiento de las muestras que influya en su viabilidad.

I.3.1.2 TRANSFORMACION DE CELULAS CD34+ EN CELULAS DENDRITICAS

Las células madre CD34+ de sangre de cordón umbilical se derivaron a células dendríticas por cultivo celular en el laboratorio. Se enriquecieron a partir de células mononucleares de sangre de cordón umbilical utilizando perlas magnéticas. Se lava dos veces en tampón fosfato salino (PBS) y aproximadamente $25\text{-}30 \times 10^5$ células/ ml se cultivan en medio RPMI-1640 (Mediatech Inc., Herndon, VA), suplementado con glutamina 2 mM (PAA Laboratories, Pasching, Austria), antibióticos y 10% de plasma autólogo de sangre de cordón, GM-CSF 20 ng/ml (Bender, Viena, Austria) y TNF α . Se añaden citoquinas a los cultivos celulares en días 4 y 8 por medio de

sustitución cuidadosa. En el día 14, se recogen las células por pipeteo suave y se caracteriza fenotípicamente la muestra para los marcadores de las células dendríticas por citofluorometría de flujo²³⁶.

I.3.2 CITOFUOROMETRÍA DE FLUJO

Las subpoblaciones celulares se obtienen por técnicas de citofluorometría de flujo con los anticuerpos monoclonales correspondientes a los diferentes subtipos, utilizando el software integrado del CellQuest que corresponde al propio citofluorómetro. Solo las poblaciones de células con pureza media de 95% fueron aceptadas y procesadas.

La citofluorometría de flujo es una técnica de análisis celular que implica medir las características de dispersión de luz y fluorescencia que poseen las células conforme pasan a través de un rayo de luz. Se basa en la difracción de la luz en sentido frontal (para medir el tamaño celular) y la reflexión de la luz de manera lateral (para medir la granularidad celular). Además, si previamente se coloca las células en presencia de anticuerpos monoclonales marcados con moléculas fluorescentes, se puede evaluar que células poseen los antígenos complementarios a los anticuerpos monoclonales usados.

Para caracterizar la membrana, las células se suspenden en buffer de PBS (phosphate buffered saline) que contiene 0,5% de albúmina bovina, incubándose con anticuerpos monoclonales durante 15 minutos a temperatura

ambiente, y lavadas (5 minutos a 1600 r.p.m) con PBS. Para el marcaje intracelular, las células se fijaron y permeabilizaron según instrucciones del fabricante (Caltag, Austria) y fueron analizadas por citofluorometría de flujo (FACScan; Becton Dickinson, San José, CA, EE.UU.) utilizando el Software CellQuest™ estándar (Becton Dickinson, San José, CA, EE.UU.) Al menos 10.000 eventos cerrados fueron analizados mediante el software WinMDI. Se explica a continuación el Protocolo de citofluorometría de flujo.

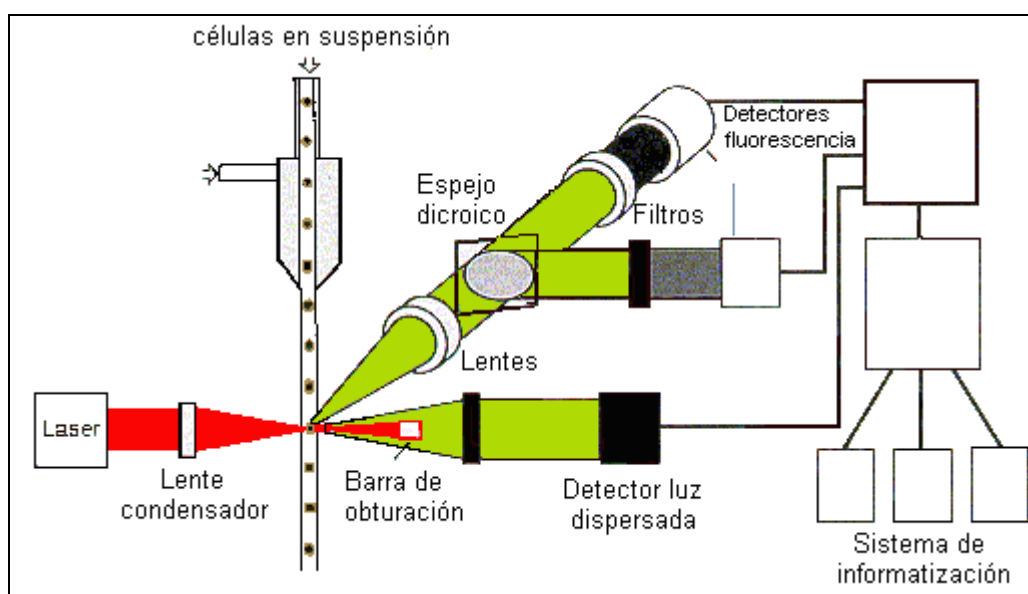


Figura 36. Esquema de un Citofluorómetro de Flujo ²⁴⁰.

Los anticuerpos monoclonales murinos y los controles de isotipo utilizados en los estudios de citofluorometría de flujo para determinación de los transcritos alternativos de HLA-G son: HLA-G (MEMG/9)-FITC, PE-CD1a, CD1a-FITC, CD14 PerCP-, CD34-PerCP, CD38-PE, CD38-FITC, CD209-PerCP (Becton Dickinson, San José, CA, EE.UU.), CD1c-PE, CD3-FITC, CD11c-PE, CD11c-APC, CD16-PE, CD19-FITC, CD19-APC, CD33-APC, CD80-FITC, CD83-PE,

CD86-PE, CD133-APC, CD303-PE y CD303-APC (Miltenyi Biotech, Bergisch).

➤ PROTOCOLO DE CITOFUOROMETRÍA DE FLUJO

❖ **Marcaje directo** (*De sangre periférica o suspensión celular*)

- ✓ Tomar una cantidad de sangre equivalente a un rango entre 200.000 y 1.000.000 células por tubo. Este valor vendrá determinado por el hemograma correspondiente. En el caso de suspensión celular se tomará el mismo número de células en aproximadamente 200 µl de PBS y se procederá del mismo modo.
- ✓ Añadir el anticuerpo monoclonal marcado con el fluoróforo (la cantidad vendrá recomendada por la casa comercial en función de la concentración y el fluoróforo usado).
- ✓ Agitar e incubar durante 15 min. a temperatura ambiente en oscuridad.
- ✓ Añadir 2 ml de solución lisante comercial (BD) (contiene dietilenglicol y formaldehído).
- ✓ Agitar e incubar durante 5 min. a temperatura ambiente.
- ✓ Centrifugar a 1200-1500 rpm durante 5 min. a temperatura ambiente.
- ✓ Decantar el sobrenadante.
- ✓ Realizar dos lavados con 5 ml de PBS centrifugando a 1200-1500 rpm 5 min. a temperatura ambiente.
- ✓ Decantar el sobrenadante.
- ✓ Resuspender el botón celular en 1 ml de PBS.
- ✓ Leer en el citofluorómetro.

❖ **Marcaje indirecto** (*De sangre periférica o suspensión celular*)

- ✓ Tomar una cantidad de sangre equivalente a un rango entre 200.000 y 1.000.000 de células por tubo. Este valor vendrá determinado por el hemograma correspondiente. En el caso de suspensión celular se

tomará el mismo número de células en aproximadamente 200 µl de PBS y se procederá del mismo modo.

- ✓ Añadir el anticuerpo monoclonal (la cantidad vendrá recomendada por la casa comercial en función de la concentración y el fluoróforo usado).
- ✓ Agitar e incubar durante 15 min. a temperatura ambiente en oscuridad.
- ✓ Realizar dos lavados con 5 ml de PBS centrifugando a 1200-1500 rpm 5 min. a temperatura ambiente.
- ✓ Añadir el anticuerpo conjugado fluorescente, también se pueden añadir en este paso otros monoclonales marcados (marcaje directo; la cantidad vendrá recomendada por la casa comercial en función de la concentración y el fluoróforo usado).
- ✓ Agitar e incubar durante 15 min. a temperatura ambiente en oscuridad.
- ✓ Añadir 2 ml de solución lisante comercial (BD) (contiene polietilenglicol y formaldehído).
- ✓ Agitar e incubar durante 5 min. a temperatura ambiente.
- ✓ Centrifugar a 1200-1500 rpm durante 5 min. a temperatura ambiente.
- ✓ Decantar el sobrenadante.
- ✓ Realizar dos lavados con 5 ml de PBS centrifugando a 1200-1500 rpm 5 min. a temperatura ambiente.
- ✓ Decantar el sobrenadante.
- ✓ Resuspender el botón celular en 1 ml de PBS.
- ✓ Leer en el citofluorómetro.

❖ **Marcaje intracelular** (*De sangre periférica o suspensión celular*).

- ✓ Tomar una cantidad de sangre equivalente a un rango entre 200.000 y 1.000.000 células por tubo (según protocolo de sangre o suspensión celular).
- ✓ Añadir el anticuerpo monoclonal de superficie (la cantidad vendrá recomendada por la casa comercial en función de la concentración y el fluoróforo usado).
- ✓ Agitar e incubar durante 15 min. a temperatura ambiente en oscuridad.

- ✓ Realizar un lavado con 5 ml de PBS centrifugando a 1200-1500 rpm 5 min. a temperatura ambiente.
- ✓ Añadir 100ul de solución A (fijadora, Caltag) e incubar 15 min.
- ✓ Realizar un lavado con 5 ml de PBS centrifugando a 1200-1500 rpm 5 min. a temperatura ambiente.
- ✓ Añadir 100ul de solución B (permeabilizante, Caltag).
- ✓ Añadir el anticuerpo monoclonal que queremos ver intracelular a la concentración indicada por la casa comercial.
- ✓ Agitar e incubar 15 min.
- ✓ Realizar dos lavados con 5 ml de PBS centrifugando a 1200-1500 rpm 5 min. a temperatura ambiente.
- ✓ Decantar el sobrenadante.
- ✓ Resuspender el botón celular en 1 ml de PBS.
- ✓ Leer en el citofluorómetro.

I.4 ESTUDIOS DE PROTEINAS

I.4.1 CUANTIFICACION DE HLA-G SOLUBLE EN SUERO DE SANGRE DE CORDÓN

Se realiza mediante la técnica de ELISA. Es un procedimiento de ensayo inmunoenzimático (enzyme linked immuno sorbent assay). La prueba utiliza anticuerpos marcados con una enzima, para revelar el reactivo complementario.

Se procede a la fijación de uno de los componentes de la reacción inmunológica a un soporte sólido, poniendo luego ese sistema en contacto con una fase fluida que contiene el reactivo complementario. El complejo inmunológico formado se enfrenta a moléculas marcadas con una enzima y un

sustrato cromogénico. La reacción inmunológica se cuantifica midiendo espectrofotométricamente la cantidad de color resultante que equivale a la cantidad de HLA-G soluble. A continuación presentamos el Protocolo de obtención de HLA-G soluble por Elisa.

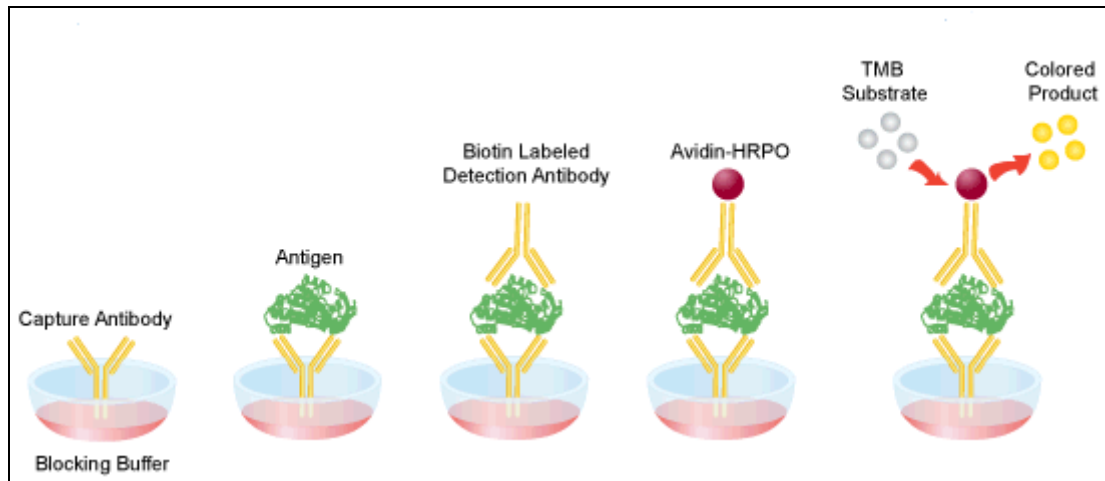


Figura 37. Técnica de ELISA²³⁶.

➤ PROTOCOLO DE OBTENCION DE HLA-G SOLUBLE POR ELISA

❖ PRECAUCIONES:

- Evitar el contacto con la STOP SOLUTION y SUBTRATE SOLUTION, llevar gafas y guantes cuando se usen estos productos.
- Reactivos con diferente n° de lote no deben mezclarse.

❖ COMPONENTES DEL KIT:

- Placas cubiertas con anticuerpo anti HLA-G de 96 pocillos.
- Conjugate solution, lista para usar.
- Standard sHLA-G, liofilizado, diluir con 200µl de agua destilada/desionizada (625 U/ml), conservar a -20°C.
- Buffer de dilución, listo para usar.
- Solución de Lavado 5X (diluir 100ml en 400ml de agua destilada).

- Substrate Solution, lista para usar.
- Stop solution, lista para usar.

Antes de comenzar un ensayo los reactivos tienen que estar a temperatura ambiente. Si no se usa la placa entera, poner las tiras sobrantes en la bolsa de aluminio con desecante y guardarla cerrada a 2-8 °C. Las muestras deben estar congeladas a -20°C, no descongelar/congelar repetidamente.

❖ **PREPARACIÓN DE STANDARDS:**

VOLUMEN DE STANDARD	BUFFER DE DILUCION	CONCENTRACION
75 µl de Standard	300 µl	125.000 U/ml
150 µl de Std. 125.000 U/ml	150 µl	62.50 U/ml
150 µl de Std. 62.50 U/ml	150 µl	31.25 U/ml
150 µl de Std. 31.25 U/ml	150 µl	15.63 U/ml
150 µl de Std. 15.63 U/ml	150 µl	7.81 U/ml
150 µl de Std. 7.81 U/ml	150 µl	3.91 U/ml
150 µl de Std. 3.91 U/ml	150 µl	1.95 U/ml

❖ **PROCEDIMIENTO:**

- ✓ Pipetear 50 µl de Buffer de dilución en los pocillos.
- ✓ Pipetear 50 µl de los estándares y las muestras (preferiblemente por duplicado) en los pocillos apropiados.
- ✓ Incubar la placa 1h. a temperatura ambiente agitándose a 300 rpm.
- ✓ Lavar la placa 3 veces con solución de lavado (350 µl por pocillo).
- ✓ Añadir 100 µl de " conjugate solution " en cada pocillo.
- ✓ Incubar la placa 1h. a temperatura ambiente, agitándose a 300 rpm.
- ✓ Añadir 100 µl de " substrate solution".
- ✓ Incubar en oscuridad 15 min. a temperatura ambiente (la incubación puede ampliarse hasta 30 min. si el cambio de color no es bueno). ¡¡No agitar!!
- ✓ Parar el cambio de color añadiendo 100 µl de " stop solution " por pocillo.

- ✓ Leer la absorbancia a 450 nm.

I.5 ESTUDIOS GENETICOS

I.5.1 DETERMINACION DE LA EXPRESION GENICA DE LAS ISOFORMAS DE HLA-G

I.5.1.1 AISLAMIENTO DE mRNA, TRANSCRIPCION REVERSA Y REACCION PCR.

Permite detectar la presencia de determinados transcritos de HLA-G. El total de mRNA se extrae con un Kit Rneasy Mini Kit (Qiagen Crawley, Reino Unido), según las instrucciones del fabricante. Esto incluye un paso específico para eliminar posible contaminación por DNA (RNasa-free DNAsa set Kit). El DNA complementario se prepara del RNA total con el sistema de transcriptasa reversa (RT-PCR) (Promega, Madison, WI, EE.UU.). La amplificación de HLA-G específico utiliza primers para determinar los distintos exones G2-5 '(5'-TCCATGAGGTATTTTCAGCGC) y GC-2a (5'-GGCTGGTCTCTGCACAAAGAGA), colocado en el exón 2 y regiones 3'UT^{237,238}. Para incrementar la señal del amplificado del DNA se realizó un proceso de PCR "nested" que consiste en la amplificación con primers específicos del amplificado obtenido con los primers genéricos usados.

Los primers específicos son: G257F (exon2; 5'-GGAAGAGGAGACACGGAACA)/ HLA GEx5-(exon5; 5'-ACAACCAGGCCAGCAACG) detecta las isoformas G1-G6; G526F (exon3; 5'-

CCAATGTGGCTGAACAAAGG) / HLA-G1 GEx5 identifica G4 y G5; G257F/i4b (intron 4; 5'-AAAGGAGGTGAAGGTGAGGG) detecta las isoformas solubles G5 y G6; G2-5 '(5'-TCCATGAGGTATTTTCAGCGC) y GC-2a (5'-GGCTGGTCTCTGCACAAAGAGA), colocado en el exón 2 y regiones 3'UT. Es decir, que la extracción de RNA, conversión a cDNA y amplificación por PCR se realizará con la metodología estándar para medir la presencia de mRNA de las moléculas de HLA-G (diferentes isoformas).

Se presenta el Protocolo de purificación del RNA total y el Protocolo RT-PCR para células mononucleares del cordón umbilical.

➤ PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN DE RNA TOTAL (Qiagen)

❖ PUNTOS IMPORTANTES ANTES DE EMPEZAR:

- Los pellet de células pueden guardarse a -70°C para usar más tarde.
- Determinar el número de células antes de congelar.
- Los homogeneizados de las células lisadas pueden guardarse a -70°C durante varios meses. Éstas pueden descongelarse en un baño a 37°C hasta que se disuelvan todas las sales. Una prolongada incubación puede comprometer la integridad del RNA.
- Si aparece material insoluble visible, centrifugar 5 minutos a 3000-5000 g y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
- Buffer RLT con precipitado, resuspender por calentamiento y mantener a temperatura ambiente.
- Todo el procedimiento se lleva a cabo a temperatura ambiente.

❖ *PREPARAR ANTES DE EMPEZAR:*

- Si el RNA purificado es rico en RNA_{sas} es recomendable añadir β-ME (β-mercaptoetanol) al buffer RLT; añadir 10 µL de β-ME por 1 ml de Buffer RLT (a temperatura ambiente aguanta hasta un mes).
- Antes de usar por primera vez el buffer RPE, añadir 4 volúmenes de etanol 96-100%.
- Preparar la DNA_{sa} I para eliminar la contaminación con DNA.
- Determinar el número de células. No usar más de 1×10^7 células.
- Centrifugar 5 minutos a 300g (1200 rpm). Eliminar con cuidado el sobrenadante por aspiración o decantación.
- Ruptura de las células por adición de Buffer RLT :

Número de células	Volumen de Buffer RLT + β-ME (µl)
$<5 \times 10^6$	350
$5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$	600

- Mezclar por pipeteo o vórtex.
- Homogeneizar la muestra (si hay muchas células) pasándola 5 veces por una aguja de 0.9mm de diámetro.
- Añadir 1 volumen de etanol al 70% (350/600 µl) y mezclar bien por pipeteo (no centrifugar).
- Transferir los 700 µl de muestra, incluido el precipitado que se haya formado, a la columna " Rneasy spin " colocada con un tubo colector de 2mL.
- Centrifugar 15 segundos a 8000 x g (> 10000 rpm). Desechar el fluido (con cuidado al sacar la columna).
- Si la muestra excede de 700 µl centrifugar en alícuotas sucesivas en la misma columna y desechar el fluido después de cada centrifugación.

▪ (Opcional) DIGESTION DNasa EN COLUMNA

- Añadir 700 µl de Buffer RW1 a la columna Rneasy (350 µl si se realiza la digestión con DNasa).
- Centrifugar 15 s a 8000 x g (> 10000 rpm) para lavar la membrana de la columna.
- Añadir 500 µl de buffer RPE a la columna. Centrifugar 2 minutos a 8000 x g (> 10000 rpm) para lavar la membrana de la columna.
- (Opcional). Se puede volver a centrifugar la columna en un tubo de colección nuevo durante 1 minuto a máxima velocidad, para asegurarnos de que se elimina cualquier resto de buffer RPE de la parte externa de la columna.
- Colocar la columna en un nuevo tubo de colección de 1,5 ml y añadir 30-50 µl de RNase free water directamente sobre la membrana de la columna. Centrifugar 1 minuto a 8000 x g (> 10000 rpm).
- Si la cantidad de RNA obtenida es mayor de 30 µg se repite el paso anterior utilizando otros 30-50 µl de agua libre de RNasas. Si es menor habría que diluir en menos cantidad de agua.
- (Opcional). También se puede realizar la *digestión con DNasa en la solución* de RNA y luego realizar el protocolo de RNA Cleanup.

▪ DIGESTION CON DNasa EN COLUMNA.**❖ Antes de utilizar:**

- Preparar la solución stock de DNasa disolviendo la DNasa liofilizada I en 550 µl de RNase free water, inyectar el agua directamente en el vial, disolver por inversión, alícuotar y congelar las alícuotas a -20°C (duran hasta 9 meses). No volver a congelar la alícuota que haya sido descongelada y mantenerla a 4°C.

❖ Protocolo:

- Añadir 350 μ l de Buffer RW1 a la columna y centrifugar a 8000 x g (> 10000 rpm) para lavar la membrana de la columna.
- Preparar el mix de incubación: mezclar 10 μ l de DNasa I stock solution con 70 μ l de Buffer RDD, por inversión (la DNasa es muy sensible a agresiones físicas) y centrifugar brevemente.
- Añadir 80 μ l del mix de incubación directamente en la membrana de la columna e incubar a 20-30°C durante 15 minutos.
- Añadir 350 μ l de buffer RW1 a la columna y centrifugar durante 15 segundos a 8000 x g (>10000 rpm). Descartar el resto y continuar en el paso del lavado con Buffer RPE.

▪ DIGESTION CON DNasa EN SOLUCIÓN

❖ *Importante antes de empezar:* no vortear la DNA_{sa} para reconstituirla. La DNA_{sa} es muy sensible a la desnaturalización física. Mezclar sólo por inversión del tubo.

❖ *Protocolo:*

- ✓ Mezclar en un tubo de microcentrífuga:
 - ≤ 87.5 μ l de la solución de RNA.
 - 10 μ l de Buffer RDD.
 - 2.5 μ l de DNA_{sa} I.
 - Completar con RN_{ase} – free water hasta 100 μ l, los volúmenes de reacción pueden duplicarse si es necesario (hasta 200 μ l).
- ✓ Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- ✓ Lavar el RNA:
 - Ajustar la muestra a un volumen de 100 μ l con RN_{ase}-free water.
 - Añadir 350 μ l de buffer RLT y mezclar bien.
 - Transferir la muestra (700 μ l) a una columna RN_{easy} mini spin con un tubo colector de 2 ml. Centrifugar 15 segundos a ≥ 8000 g (≥ 10000 rpm). Descartar el sobrenadante completamente.

- Añadir a la columna 500 µl de buffer RPE. Centrifugar 15 segundos a ≥ 8000 g (≥ 10000 rpm) para lavar la membrana de la columna. Descartar el sobrenadante.
- Añadir a la columna 500 µl de buffer RPE. Centrifugar 2 minutos a ≥ 8000 g (≥ 10000 rpm) para lavar la membrana de la columna. Descartar sobrenadante.
- (OPCIONAL). Transferir la columna a un nuevo tubo colector de 2 ml. Centrifugar 1 minuto a máxima velocidad.
- Transferir la columna a un nuevo tubo colector de 1.5 ml. Añadir 30-50 µl de RN_{ase}-free water a la columna. Centrifugar 1 minuto a ≥ 8000 g (≥ 10000 rpm). Recoger el eluido, que contiene el RNA.
- Si la cantidad de RNA es superior a 30 µg repetir el paso anterior reutilizando el tubo colector.

➤ **PROTOCOLO RT-PCR PARA MONONUCLEARES DE CORDÓN UMBILICAL**

- ❖ *Muestra:* RNA de mononucleares de sangre de cordón umbilical.
- ❖ *Primers:* G2-5' y GC-2a (HLA-G).

- **RT-PCR en dos pasos.**
- **RT (Reverse Transcription Systems, Promega).**

Se puede realizar con oligo (dT) o con primers aleatorios.

- ✓ Calentar el RNA que va a ser amplificado en un baño (seco o no) a 70°C durante 10 minutos. Luego centrifugar brevemente y meter en hielo.
- ✓ RNA:
 - 1 µg de mRNA + poli(A).
 - 1 µg de RNA total.
 - 1 µg (2 µl) de RNA control positivo, kanamicina 1,2 kb.
- ✓ Calcular la cantidad de RNA mediante electroforesis o absorbancia (abs. 260nm = 1 → 40 µg /ml de RNA).

- ✓ Preparar la mezcla de reacción añadiendo los siguientes reactivos en este orden:

Componente	Ci	Cf.	Cantidad
MgCl ₂	25 mM	5 mM	4 µl
RT Buffer	10X	1X (*)	2 µl
dNTP mix		1mM/dNTP	2 µl
Ribon. Inhib.		1U/µl	0.5 µl
AMV RT	20U/µl	15U/µg RNA	15U (0.75 µl)
Oligo d (T)			
Random primer	0.5 µg/µl	0.5 µg/µg RNA	0.5 µg (1µl)
RNA o control (+)		50ng/µl	1 µg (**)
H ₂ O nucl. Free			hasta 20 µl
Vt		20 µl	

(*) 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.1% triton.

(**) El volumen depende de la concentración de RNA que tengamos.

- ✓ Con el primer oligo (dT) incubar la reacción a 42°C 15 minutos.
- ✓ Con random primers incubar a temperatura ambiente 10 minutos y después 15 minutos a 42°C.
- ✓ Calentar 5 minutos a 95°C, luego incubar de 0-5°C otros 5 minutos para inactivar la AMV RT.
- ✓ La muestra puede ser utilizada para análisis en gel de agarosa, para síntesis de la segunda cadena de cDNA, para amplificación por PCR. Si no va a ser inmediatamente utilizada congelar a -20°C hasta su uso.

- ❖ **PCR:** preparar un mix para la reacción de secuenciación con la siguiente composición:

Componente	Ci	Cf.	Cantidad
DNA de la PCR			2 µl
dNTP mix		200µM/Dntp	
PCR Buffer	10X	1X	10 µl
Taq polimerasa		2.5 U	
Oligo 1	100 µM	100 ng	
Oligo 2	100 µM	100 ng	
H ₂ O nucleasa free			hasta 40 µl
Vt			40 µl

❖ **Master Mix (Promega):**

Componente	Ci	Cf.	Cantidad
Master Mix + enz	2x	1x	12.5 µl
G2-5'/CD1Df	100 µM	0.1-1 µM (150 ng)	0.25 µl
Gc-2a/CD1dR	100 µM	0.1-1 µM (150 ng)	0.25 µl
H2O nucleasa free			Hasta 25 µl
DNA de la PCR		< 250 ng	5 µl
Vt			25 µl

Master Mix	C1	Cf
Taq polimerasa	50 U/ml	0.625 U
Dntp	400µM	200 µM/dNTP
MgCl	3 mM	1.5 Mm

- ✓ Programar el termociclador, situar los tubos y hacer la RT-PCR.

❖ **HLA-G:**

	Tiempo	Temperatura
Activación inicial	5 min.	94°
Desnaturalización	20 seg.	94°
Activación	1 min.	55°
Elongación	75 seg.	72°
Extensión final	10 min.	72°

❖ **RT-PCR en un paso:**

- ✓ Descongelar el RNA molde, los primers, el dNTP mix, el buffer 5x QIAGEN OneStep RT-PCR, el agua Rnase-free y ponerlo en hielo.
- ✓ Es importante mezclar las soluciones completamente antes de su uso para evitar diferencias en la concentración de sal.

❖ Preparar un master mix:

Componente	Volumen x1
Buffer 5x (12,5 mM MgCl ₂)	5 µl
dNTP Mix (10 mM/nt)	1 µl
Primer A (100µM)	0.25 µl
Primer B (100 µM)	0.25 µl
Mix de enzimas	1 µl
Inhibidor Rnasa (opcional)	
Agua Rnase-free	Variable (hasta completar 25 µl)
Template RNA	5-10 µl
V total	25 µl

- ✓ Es importante preparar un 10% más de la cantidad deseada teniendo en cuenta que puede faltar solución por errores de pipeteo.
- ✓ Es importante, también, realizar un control negativo con el master mix pero sin RNA.
- ✓ Mezclar bien el master mix y dispensar el volumen adecuado en cada tubo.
- ✓ Añadir el " RNA template" o molde a cada tubo. Máximo 2 µg/reacción.
- ✓ Programar el termociclador, situar los tubos en el mismo y lanzar la RT-PCR.

HLA-G	Tiempo	Temperatura
Trascripción reversa	30 min.	50°C
Activación inicial	5 min.	94°C
Desnaturalización	20 seg.	94°C
Hibridación	1 min.	55°C
Elongación	75 seg.	72°C
Extensión final	10 min.	72°C.

I.5.1.2 SECUENCIACION DE TRANSCRITOS ALTERNATIVOS HLA-G

Los transcritos de PCR del HLA-G se secuencian utilizando los mismos primers o cebadores específicos de amplificación para su confirmación. Los productos de PCR se purifican usando la metodología del ExoSAP-IT[®] (USB

Corporation, Cleveland, OH) cuando se obtenga solo una banda. Cuando se obtiene más de una banda, se debe extraer y purificar con el kit de purificación de gel Illustra™ ® GFX PCR DNA (GE Healthcare, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos obtenidos se secuencian en ambas direcciones por el método del DNA BigDye Terminador Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) en un secuenciador ABI PRISM 3700, con su software. Para evitar errores en el procesamiento de la PCR, cada muestra fue secuenciada a partir de dos amplificaciones diferentes de PCR²⁴⁰. La alineación de las secuencias obtenidas se realizó utilizando el software MEGA 3.1 con las correspondientes secuencias publicadas (IMGT-HLA de base de datos: [www.ebi.ac.uk / IMGT / HLA](http://www.ebi.ac.uk/IMGT/HLA))²⁴¹. Se presenta el Protocolo de extracción de DNA.

➤ PURIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL cDNA AMPLIFICADO

❖ PURIFICACIÓN:

- ✓ Por cada 5 µl de producto de PCR se añaden 2µl de Exosap y los llevamos al termociclador (programa Exosap →37°C 15min; 80°C 15min). Ahora está listo para secuenciar.
- ✓ Si se va a tardar menos de 48h en secuenciar se guarda en nevera a 4°C, sino conservar a -18°C.

❖ SECUENCIACIÓN:

- ✓ En campana, en tubos eppendorf dos tubos por cada muestra, se añaden por este orden:

FORWARD	REVERSE
5 µl H ₂ O	5 µl H ₂ O
1 µl primer o cebador 1	1 µl primer o cebador 2
2 µl de MIX (Taq, Mg ²⁺ , dNTP's marcados)	2 µl de MIX
2 µl AND	2 µl AND

- ✓ Si las bandas de la electroforesis son flojas se añade más cantidad de ADN y se echa menos cantidad de H₂O destilada, de manera que siempre en el tubo queden 10 µl de la mezcla.
- ✓ Los reactivos se llevan rápidamente a la nevera y el ADN se añade fuera de la campana.
- ✓ Programa de secuenciación:
 - 98 °C → 5 seg.
 - 30 ciclos de:
 - 96 °C → 10 seg.
 - 65 °C → 1 min.
 - 4 °C → ∞

I.5.1.3 SECUENCIACION DE NUEVOS ALELOS HLA-G

El polimorfismo del HLA-G se estudió en 32 muestras de sangre de cordón umbilical obtenidos en pacientes con cesárea a término, aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico San Carlos. El ADN total fue extraído utilizando el Mini Kit (Qiagen, Crawley, Reino Unido) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con cebadores G257F, G526F, HLA-GEx5, GC-2a, G3UT1.0, GEx3.3 y G1046F, para la amplificación específica de HLA-G, la secuenciación directa y la clonación.

La secuencia obtenida comprende una región de 3,25 kb (región parcial de 3'UT, todos los exones e intrones y las regiones parciales de 5'UT). Las bandas obtenidas se ligaron a un PCR ® 2.1 - TOPO 3,9 kb del plásmido (Kit de clonación TOPO TA, Invitrogen, Carisbad, CA), y se inserta en las células competentes de Escherichia coli TOP10F (Invitrogen).

Los productos HLA-G de la PCR y los plásmidos fueron secuenciados utilizando los mismos cebadores de amplificación específicos y purificados usando metodología ExoSAP-IT® (USB Corporation, Cleveland, OH). Los ciclos de secuenciación en ambas direcciones utilizaron un Kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems, Foster City, CA) y un secuenciador de ADN automatizado ABI PRISM 3700. Para evitar errores, la muestra fue secuenciada a partir de, al menos, dos amplificaciones de PCR diferentes y de varias colonias. Las moléculas HLA-A, HLA-B y HLA-DRB1 se determinaron por tecnología Luminex y Kits de oligonucleótidos específicos de los loci.

II. METODOLOGIA ESTADISTICA

Es un estudio descriptivo, de corte transversal, de casos y controles de muestras de sangre de cordón umbilical de gestantes a término. Las secuencias generadas se analizaron con el programa SEQin (Applied Biosystems) y secuencias contiguas de las reacciones directa e inversa de los PCRs. Múltiples análisis de alineación de secuencia se calcularon usando el algoritmo ClustalW (Higgins et al, 1994, Instituto Europeo de Bioinformática; <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>)²⁴². Los análisis moleculares se realizaron utilizando MEGA versión 4.0.2²⁴⁰, y el programa de detección de recombinación (RDP; versión 3,12).

En el caso de la cuantificación de la expresión génica de las isoformas, se realiza amplificación de los transcritos y los calibradores correspondientes

llevan un reactivo que se unen al DNA y se representa en una gráfica respecto al número de ciclos de amplificación y relacionando estos datos con los calibradores podemos conocer la cantidad de DNA que se ha producido en cada ciclo.

RESULTADOS

I. ESTUDIO DESCRIPTIVO

Las pacientes pertenecientes al estudio completaron un tamaño muestral de 35 casos con una mediana de edad de 32 años en el momento de la cesárea. Se consiguió la recogida de sangre de 35 cordones umbilicales y 35 buffy coats de sangre periférica de adulto y 35 muestras de sangre de gestantes a término.

Se realizó la inmunofenotipación de las tres subpoblaciones de células madre hematopoyéticas (CD133+/CD34+, CD133+/CD34-, CD133-/CD34+). Se confirmó la presencia de HLA-G y CD1d en aquellas subpoblaciones de células madre hematopoyéticas que expresaban CD1a en las muestras de los cordones umbilicales, probables precursoras de células dendríticas. Se estudió las poblaciones de células dendríticas de cordón y se usó como marcadores CD1a, CD209, CD1c (marcador de células dendríticas mieloides), CD303 (marcador de células dendríticas plasmocitoides) y CD11c.

Se realizó la medida de expresión génica de superficie e intracelular de HLA-G y CD1d y la búsqueda de las distintas isoformas de HLA-G tanto en las células madre de cordón umbilical y en los subtipos de células dendríticas. Para ello se realizó la separación magnética de las distintas subpoblaciones (células madre CD34+, células madre CD133+, células dendríticas mieloides y células dendríticas plasmocitoides).

II. ESTUDIO ANALITICO

II.1 EXPRESION DE PROTEINAS HLA-G EN DIFERENTES SUBTIPOS DE CELULAS DE SANGRE DE CORDON UMBILICAL.

II.1.1 EXPRESIÓN PROTEICA INTRACELULAR Y SUPERFICIAL DE HLA-G EN LAS DISTINTAS SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS MADRE CD34+.

La Tabla 1 muestra la expresión en superficie de la proteína HLA-G en subpoblaciones CD34/CD133/CD38 de células madre de cordón umbilical. La tabla 2 muestra la expresión intracelular.

Se confirmó la presencia de HLA-G intracelular y superficial en las tres subpoblaciones de células madre CD34 (CD34+/CD133+, CD34+/CD133-, CD34-/CD133+), por citometría de flujo. Se observó que existen poblaciones CD38 negativas en la subpoblación CD34+/CD133- (n=8) en relación con las otras dos (n=2 en CD34+/CD133+ y n=3 en CD34-/CD34+) (Tabla 1 y 2).

Respecto a la expresión de HLA-G en la superficie, se encuentran en valores similares en las tres subpoblaciones, expresándose ligeramente menos en la CD34+/CD133+ (más inmadura) entre valores de 4.1 y 36.5 (Tabla 1). Los porcentajes son más elevados en la expresión intracelular (12.5-88.1) (Tabla 2) lo que indica la presencia de dicha proteína en la célula.

Tabla 1. Expresión en superficie de HLA-G en las distintas subpoblaciones CD34/CD133/CD38 de células madre de sangre de cordón umbilical.

MUESTRAS	CD34%	CD 133%	CD34+/CD133+ (%)					CD34+/CD133- (%)					CD34-/CD133+ (%)				
			TOTAL	CD38+ (%)		CD38- (%)		TOTAL	CD38+ (%)		CD38- (%)		TOTAL	CD38+ (%)		CD38- (%)	
				TOTAL	HLA-G	TOTAL	HLA-G		TOTAL	HLA-G	TOTAL	HLA-G		TOTAL	HLA-G		
CUI-13	0.59	0.44	81.0	100	9.39	0	---	19.0	100	8.1	0	---	6.7	100	8.9	0	---
CUI-15	0.53	0.4	87.9	100	8.26	0	---	12.1	100	9.2	0	---	22.7	100	21.1	0	---
CUI-19	0.28	0.19	68.7	100	14.9	0	---	31.3	71.9	10.3	28.1	0	4.8	75.0	15.0	25.0	0
CUI-20	0.22	0.15	64.7	100	11.4	0	---	35.3	84.4	11.1	15.6	0	21.9	100	37.5	0	---
CUI-21	0.34	0.22	85.8	100	9.0	0	---	14.2	68.4	10.5	31.6	0	12.2	100	14.9	0	---
CUI-22	0.4	0.27	82.8	ND				18.2	ND				ND				
CUI-23	0.35	0.26	76.6	100	4.1	0	---	23.4	100	11.9	0	---	6.3	100	6.45	0	---
CUI-24	0.66	0.41	76.2	100	36.5	0	---	23.8	91.8	8.16	8.2		ND				
CUI-27	0.38	0.20	70.0	100	4.48	0	---	30.0	100	14.63	0	---	28.85	91.6	20.0	8.4	0
CUI-28	0.61	0.45	76.5	98.8	4.25	1.2	0	23.5	84.62	10.61	15.38	0	9.5	100	14.4	0	---
CUI-35	0.42	0.31	79.2	100	5.2	0	---	20.8	100	7.9	0	---	6.4	100	6.8	0	---
CUI-37	0.51	0.39	80.6	100	4.65	0	---	19.4	83.5	10.2	16.5	0	5.9	100	9.3	0	---
CUI-41	0.33	0.26	81.7	97.9	4.91	2.1	0	18.3	92.3	8.9	7.7	0	10.1	89.7	19.6	10.3	0
CUI-42	0.39	0.29	82.0	100	9.3	0	---	18.0	100	12.4	0	---	19.2	100	12.8	0	---
CUI-45	0.46	0.35	74.3	100	6.4	0	---	25.7	76.3	9.4	23.7	0	5.3	100	14.3	0	---

ND: No realizado. NV: No valorable.

Tabla 2. Expresión intracelular de HLA-G en las distintas subpoblaciones CD34/CD133/CD38 de células madre de sangre de cordón umbilical

MUESTRAS	CD34%	CD133%	CD34+/CD133+ (%)					CD34+/CD133- (%)					CD34-/CD133+ (%)				
			TOTAL	CD38+ (%)		CD38-(-%)		TOTAL	CD38+ (%)		CD38-(-%)		TOTAL	CD38+ (%)		CD38-(-%)	
				TOTAL	HLA-G	TOTAL	HLA-G		TOTAL	HLA-G	TOTAL	HLA-G		TOTAL	HLA-G	TOTAL	HLA-G
CUI-15	0.74	0.54	88.4	100	48.1	0	---	12.6	100	84.6	0	---	8.4	100	46.9	0	---
CUI-21	0.82	0.75	67.1	100	38.4	0	---	32.9	100	25.0	0	---	13.0	100	57.1	0	---
CUI-22	0.74	0.38	76.3	100	61.2	0	---	23.7	100	35.19	0	---	18.1	100	18.7	0	---
CUI-23	0.99	0.89	76.56	100	69.2	0	---	23.44	100	73.33	0	---	11.4	100	68.8	0	---
CUI-24	0.62	0.47	76.19	100	38.1	0	---	26.76	100	17.54	0	---	21.96	100	40.4	0	---
CUI-27	0.32	0.17	71.80	100	52.2	0	---	28.20	100	36.0	0	---	26.76	NV			
CUI-28	0.97	0.81	78.50	100	88.1	0	---	21.5	100	74.81	0	---	10.31	96.00	74.7	4.0	0
CUI-35	0.51	0.41	79.8	100	12.5	0	---	20.2	100	26.7	0	---	6.9	100	23.5	0	---
CUI-37	0.62	0.52	81.5	100	34.9	0	---	18.5	100	36.2	0	---	13.4	100	19.9	0	---
CUI-41	0.36	0.28	83.7	100	31.6	0	---	16.3	100	48.9	0	---	20.2	100	34.2	0	---
CUI-42	0.41	0.31	86.1	100	21.3	0	---	14.0	100	23.4	0	---	14.9	100	41.5	0	---
CUI-45	0.48	0.39	79.4	100	17.5	0	---	20.6	100	15.8	0	---	13.4	100	29.8	0	---

ND: No realizado. NV: No valorable.

✓ EXPRESION CD1a

Dado que las células dendríticas de sangre de cordón umbilical expresan en un alto porcentaje el HLA-G, se estudió la presencia de un marcador característico de estas células, CD1a, en los distintas subpoblaciones de las células madre hematopoyéticas.

Si consideramos la presencia o ausencia de CD1a en las diferentes subpoblaciones de células madre, encontramos que la expresión es elevada, sobre todo, en las subpoblaciones CD34+.

El marcador CD1a se expresó en los distintos subtipos en distintos porcentajes: CD133+/CD34+: (7.01-16.1), CD133-/CD34+: (6.8-22.95), CD133+/CD34-: (14.7-100), sugiriendo que este último subtipo pudiera tener más implicación en la generación de células dendríticas (Tabla 3).

Se estudió la expresión de HLA-G en la superficie de los tres subtipos de células madre hematopoyéticas que además son CD1a positivos. Los valores del HLA-G son similares en las tres subpoblaciones pudiendo ir desde 14.6 de las células CD1a hasta el 100% (Tabla 3 y Figura 1). Es decir, la expresión del HLA-G aparecía en los precursores de las células dendríticas. Las células madre que no son CD1a no expresan HLA-G.

Tabla 3. Expresión en superficie de HLA-G en las distintas subpoblaciones CD34/CD133/CD1a de células madre de sangre de cordón umbilical.

MUESTRAS	CD34%	CD133%	CD34+/CD133+ (%)						CD34+/CD133- (%)						CD34-/CD133+ (%)					
			TOTAL	CD1a + (%)			CD1a - (%)			TOTAL	CD1a + (%)			CD1a - (%)			TOTAL	CD1a + (%)		
				TOTAL	HLA-G		TOTAL	HLA-G			TOTAL	HLA-G		TOTAL	HLA-G			TOTAL	HLA-G	
CUI-20	0.22	0.15	58.7	16.1	71.2	83.9	0	41.3	14.5	100	85.5	0	42.7	100	100	0	---			
CUI-21	0.4	0.3	67.7	14.6	100	85.4	0	32.3	9.4	100	90.6	0	17.0	75.0	100	25.0	0			
CUI-27	0.24	0.17	61.39	8.85	NV	91.15	0	13.11	22.95	28.7	NV		NV							
CUI-28	0.39	0.27	77.0	7.01	37.5	92.99	NV	23.49	10.49	17.65	89.51	0	15.3	21.26	25.9	88.74	0			
CUI-35	0.42	0.31	79.2	9.3	48.6	90.7	0	20.8	16.4	26.4	83.6	0	6.4	NV	NV	NV				
CUI-37	0.51	0.39	80.6	12.7	68.7	87.3	0	19.4	19.3	19.3	80.7	0	5.9	14.7	68.9	85.3	0			
CUI-41	0.33	0.26	81.7	15.7	46.3	84.3	0	18.3	8.4	66.5	91.6	0	10.1	42.8	34.6	57.2	0			
CUI-42	0.39	0.29	82.0	9.6	39.8	90.4	0	18.0	6.8	21.7	93.2	0	19.2	39.7	22.7	60.3	0			
CUI-45	0.46	0.35	74.3	8.1	59.3	91.9	0	25.7	12.6	14.3	87.4	0	5.3	42.1	59.0	57.9	0			

ND: No realizado. NV: No valorable.

Los valores de expresión intracelular varían entre el 20 y el 100% de las células, con lo que su producción es activa y no se diferencia excesivamente entre los distintos subtipos de células madre.(Tabla 4, Figura 1).

Figura 1. Expresión de HLA-G en células dendríticas CD209+/CD1a+.

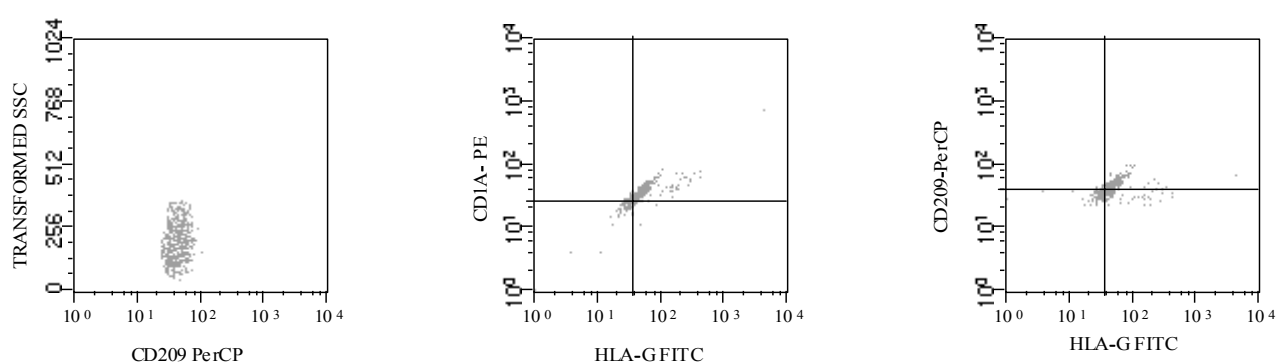


Tabla 4. Expresión intracelular de HLA-G en las distintas subpoblaciones CD34/CD133/CD1a de células madre de sangre de cordón umbilical.

MUESTRAS	CD34%	CD133%	CD34+/CD133+ (%)						CD34+/CD133- (%)						CD34-/CD133+ (%)					
			TOTAL	CD1a + (%)			CD1a - (%)			TOTAL	CD1a + (%)			CD1a - (%)			TOTAL	CD1a + (%)		
				TOTAL	HLA-G	HLA-G	TOTAL	HLA-G	HLA-G		TOTAL	HLA-G	HLA-G	TOTAL	HLA-G	HLA-G		TOTAL	HLA-G	HLA-G
CUI- 24	0.59	0.21	69.04	4.95	20.1	95.05	0	30.96	25.0	36.5	75.0	0	NV							
CUI- 27	0.45	0.36	77.0	7.01	37.5	92.99	0	23.0	11.59	95.0	82.46	0	16.7	4.4	50	95.6	0			
CUI- 28	0.75	0.63	77.71	3.57	63.6	96.43	0	22.29	5.16	100	94.84	0	4.54	6.54	20.0	93.46	0			
CUI- 35	0.51	0.41	79.8	5.8	56.4	94.2	0	20.2	8.2	54.6	91.8	0	6.9	5.1	31.2	94.9	0			
CUI- 37	0.62	0.52	81.5	11.8	68.3	88.2	0	18.5	12.6	71.3	87.4	0	13.4	4.8	22.3	95.2	0			
CUI- 41	0.36	0.28	83.7	6.9	34.5	92.1	0	16.3	10.5	41.4	89.5	0	20.2	3.9	16.8	96.1	0			
CUI- 42	0.41	0.31	86.1	7.5	42.6	92.5	0	14.0	21.8	69.8	78.2	0	14.9	7.0	19.3	93.0	0			
CUI- 45	0.48	0.39	79.4	10.42	29.4	89.58	0	20.6	9.9	44.3	90.1	0	13.4	6.2	23.6	93.8	0			

ND: No realizado. NV: No valorable.

✓ EXPRESIÓN CD1d

El marcador CD1d es una molécula constitutiva de las células madre tanto en sangre de cordón umbilical como en sangre periférica. Se determinó la expresión de este marcador en las distintas subpoblaciones CD34/CD133/CD38/CD1a.

La expresión de CD1d en la superficie se encuentra distribuida de una manera diferencial, de modo que en las dos subpoblaciones CD34+ los valores oscilan entre 3.05-33.52%, mientras que en la subpoblación CD133+/CD34- estos valores son más elevados (25% al 66.67%) (Tabla 5). Estos datos concuerdan con los obtenidos intracelularmente ya que del mismo modo, esta subpoblación produce CD1d en mayor número de células (Tabla 6).

En el caso de las células madre CD34-/CD133+ se encuentran valores de expresión de CD1d entre 0 a 82.61%, con un valor medio del 40% en aquellas que son CD1a negativas (Tabla 7). Esto indica se que está generando un paso intermedio en la ontogenia celular.

La expresión intracelular de CD1d en las distintas subpoblaciones CD1a positivas es muy elevada (Tabla 8). Las células CD34+/CD133- tienen una expresión intracelular muy pequeña indicando una producción muy baja por inmadurez.

Tabla 5. Expresión en superficie de CD1d en las distintas subpoblaciones CD34/CD133/CD38 de células madre de sangre de cordón umbilical.

MUESTRAS	CD34 %	CD13 3%	CD34+/CD133+ (%)					CD34+/CD133- (%)					CD34-/CD133+ (%)				
			TOTAL	CD38+ (%)		CD38- (%)		TOTAL	CD38+ (%)		CD38- (%)		TOTAL	CD38+ (%)		CD38- (%)	
				TOTAL	CD1d	TOTAL	CD1d		TOTAL	CD1d	TOTAL	CD1d		TOTAL	CD1d	TOTAL	CD1d
CUI- 13	0.59	0.44	81.0	100	9.25	0	---	19.0	NV				6.7	100	25.0	0	---
CUI- 15	0.53	0.4	87.9	100	24.4	0	---	12.1	77.2	18.3	22.8	0	22.7	100	57.0	0	---
CUI- 19	0.28	0.19	68.7	100	4.8	0	---	31.3	71.9	14.2	28.1	0	4.8	100	47.1	0	---
CUI- 20	0.22	0.15	64.7	100	13.1	0	---	35.3	95.9	9.6	4.1	0	21.9	ND			
CUI- 21	0.34	0.22	85.8	100	9.7	0	---	14.2	100	25.5	0	---	12.2	100	54.6	0	---
CUI- 22	0.4	0.27	82.86	ND			---	18.2	ND				ND		ND		
CUI- 23	0.35	0.26	76.56	ND				23.4	ND				6.3		ND		
CUI- 24	0.66	0.41	76.19	ND				23.8	ND				ND		ND		
CUI- 27	0.38	0.20	69.96	100	3.05	0	---	30.0	100	13.86	0	---	28.85	91.65	50.0	8.35	0
CUI- 28	0.61	0.45	76.58	100	5.0	0	---	23.5	92.86	33.52	7.14	0	9.5	100	66.6 7	0	
CUI- 35	0.42	0.31	79.2	100	4.9	0	---	20.8	100	21.3	0	---	6.4	100	46.3	0	---
CUI- 37	0.51	0.39	80.6	100	6.8	0	---	19.4	83.5	19.8	16.5	0	5.9	100	55.7	0	---
CUI- 41	0.33	0.26	81.7	97.9	11.7	2.1	0	18.3	92.3	15.5	7.7	0	10.1	89.7	48.3	10.3	0
CUI- 42	0.39	0.29	82.0	100	14.9	0	---	18.0	100	9.9	0	---	19.2	100	61.3	0	---
CUI- 45	0.46	0.35	74.3	100	16.8	0	---	25.7	76.3	8.6	23.7	0	5.3	100	52.3	0	---

Tabla 6. Expresión intracelular de CD1d en las distintas subpoblaciones CD34/CD133/CD38 de células madre de sangre de cordón umbilical.

MUESTRAS	CD34 %	CD133 %	CD34+/CD133+ (%)				CD34+/CD133- (%)				CD34-/CD133+ (%)						
			TOTAL	CD38+ (%)		CD38-(%)		TOTAL	CD38+ (%)		CD38-(%)		TOTAL	CD38+ (%)		CD38-(%)	
				TOTAL	CD1d	TOTAL	CD1d		TOTAL	CD1d	TOTAL	CD1d		TOTAL	CD1d	TOTAL	CD1d
CUI-15	0.74	0.54	88.4	100	25.3	0	---	12.6	100	21.4	0	---	2.0	100	30.0	0	---
CUI-21	0.82	0.75	67.1	100	ND			32.9	100	NV			12.2	100	54.6	0	---
CUI-22	0.74	0.38	76.3	100	ND			23.7	100	NV			NV				
CUI-23	0.99	0.89	76.56	100	ND			23.44	100	NV			NV				
CUI-24	0.62	0.47	76.19	100	10.4	0	---	26.76	100	8.0	0	---	7.43	100	38.4	0	---
CUI-27	0.32	0.17	71.80	100	4.07	0	---	28.20	100	20.34	0	---	10.85	100	48.6	0	---
CUI-28	0.97	0.81	78.50	100	6.75	0	---	21.5	77.58	12.70	22.44	19.20	10.31	90.73	47.3	9.27	0
CUI-35	0.51	0.41	79.8	100	5.6	0	---	20.2	100	16.4	0	---	6.9	100	39.8	0	---
CUI-37	0.62	0.52	81.5	100	4.9	0	---	18.5	100	14.3	0	---	13.4	100	45.6	0	---
CUI-41	0.36	0.28	83.7	100	6.6	0	---	16.3	100	12.8	0	---	20.2	100	49.8	0	---
CUI-42	0.41	0.31	86.1	100	9.5	0	---	14.0	100	19.7	0	---	14.9	100	53.3	0	---
CUI-45	0.48	0.39	79.4	100	7.3	0	---	20.6	100	16.7	0	---	13.4	100	43.8	0	---

ND: No realizado. NV: No valorable.

Tabla 7. Expresión en superficie de CD1d en las distintas subpoblaciones CD34/CD133/CD1a de células madre de sangre de cordón umbilical.

MUESTRAS	CD34 %	CD133 %	CD34+/CD133+ (%)						CD34+/CD133- (%)						CD34-/CD133+ (%)									
			TOTAL	CD1a + (%)		CD1a - (%)		TOTAL	CD1a + (%)		CD1a - (%)		TOTAL	CD1a + (%)		CD1a - (%)		TOTAL	CD1a + (%)		CD1a - (%)			
				TOTAL	CD1d	TOTAL	CD1d		TOTAL	CD1d	TOTAL	CD1d		TOTAL	CD1d	TOTAL	CD1d		TOTAL	CD1d	TOTAL	CD1d	TOTAL	CD1d
CUI- 27	0.31	0.14	57.29	9.1	95.0	90.9	5.1	42.71	8.87	95.0	91.13	0	34.01	9.27	23.0	90.13	0							
CUI- 28	0.39	0.27	58.45	6.9	82.2	93.1	8.7	41.55	16.13	68.0	83.87	0	21.53	25.81	87.5	74.19	82.61							
CUI- 35	0.42	0.31	79.2	9.3	84.3	90.7	6.3	20.8	16.4	79.8	83.6	0	6.4	NV	NV	NV	NV							
CUI- 37	0.51	0.39	80.6	12.7	75.6	87.3	5.8	19.4	19.3	69.8	80.7	0	5.9	14.7	36.8	85.3	42.3							
CUI- 41	0.33	0.26	81.7	15.7	89.3	84.3	8.1	18.3	8.4	86.5	91.6	0	10.1	42.8	42.9	57.2	44.6							
CUI- 42	0.39	0.29	82.0	9.6	68.9	90.4	7.9	18.0	6.8	87.9	93.2	0	19.2	39.7	79.8	60.3	67.8							
CUI- 45	0.46	0.35	74.3	8.1	85.6	91.9	6.2	25.7	12.6	78.6	87.4	0	5.3	42.1	22.4	57.9	35.5							

ND: No realizado. NV: No valorable.

Tabla 8. Expresión intracelular de CD1d en las distintas subpoblaciones CD34/CD133/CD1a de células madre de sangre de cordón umbilical.

MUESTRAS	CD34 %	CD133 %	CD34+/CD133+ (%)				CD34+/CD133- (%)				CD34-/CD133+ (%)						
			TOTAL	CD1a+ (%)		CD1a - (%)		TOTAL	CD1a + (%)		CD1a - (%)		TOTAL	CD1a + (%)		CD1a - (%)	
				TOTAL	CD1d	TOTAL	CD1d		TOTAL	CD1d	TOTAL	CD1d		TOTAL	CD1d	TOTAL	CD1d
CUI- 27	0.31	0.14	78.58	4.07	100	85.03	0	21.42	11.02	46.15	88.08	0	10.85	13.51	100	86.49	0
CUI- 28	0.59	0.60	79.63	6.87	21.2	93.13	0	20.37	8.75	18.42	91.25	13.02		13.95	31.5	86.05	52.0
CUI- 35	0.51	0.41	79.8	5.8	35.4	94.2	0	20.2	8.2	32.4	91.8	0	6.9	5.1	42.6	94.9	57.8
CUI- 37	0.62	0.52	81.5	11.8	43.2	88.2	0	18.5	12.6	24.5	87.4	0	13.4	4.8	67.8	95.2	46.7
CUI- 41	0.36	0.28	83.7	6.9	78.7	92.1	0	16.3	10.5	39.8	89.5	0	20.2	3.9	56.7	96.1	69.8
CUI- 42	0.41	0.31	86.1	7.5	34.5	92.5	0	14.0	21.8	21.3	78.2	0	14.9	7.0	23.5	93.0	39.8
CUI- 45	0.48	0.39	79.4	10.42	56.7	89.58	0	20.6	9.9	34.7	90.1	0	13.4	6.2	78.9	93.8	28.9

ND: No realizado. NV: No valorable

II.1.2 EXPRESIÓN PROTEICA INTRACELULAR Y SUPERFICIAL DE HLA-G EN CÉLULAS DENDRÍTICAS.

Las células dendríticas son las células presentadoras de antígeno más potentes. Existen dos tipos: células mieloides y plasmocitoides. Ambos subtipos derivan de las células madre CD34+.

Se analizó la expresión de CD1c (BDCA1) y CD303 (BDCA2) y, a continuación, CD123, CD11c, CD33, CD1a, CD14 y HLA-DR por citometría de flujo, para evaluar la pureza de los subconjuntos de células dendríticas inmaduras. En cada caso, los datos estaban en concordancia con otros publicados, con una pureza media de 96%.

Como se observa en las Tablas 9 y 10, la expresión de HLA-G en las células dendríticas mieloides (CD11c+) y plasmocitoides (CD11c -) que además son CD1a+, oscila para la expresión de superficie entre valores de: (54.3 -100) y (21.3 - 51.2), respectivamente, e intracelularmente con valores de (61.4 -100) y (26.8 - 55.6), es decir, la expresión intracelular mostró un porcentaje más alto.

Tabla 9. Expresión en superficie de HLA-G en las distintas subpoblaciones de células dendríticas (mieloides y plasmocitoides) de sangre de cordón umbilical.

MUESTRAS	CD1a+(CD14-)				
	TOTAL	CD11c + (%)		CD11c - (%)	
		TOTAL	HLA-G	TOTAL	HLA-G
CUI- 20	6.8	31.7	100	68.3	100
CUI- 21	9.6	55.6	100	44.4	51.2
CUI- 22	7.1	60.8	88.5	39.2	47.3
CUI- 23	1.7	86.2	57.0	14.8	45.0
CUI- 28	36.2	99.2	100	0.84	Nv
CUI- 35	12.4	64.3	72.3	35.7	39.8
CUI- 37	8.9	71.2	69.8	28.8	49.7
CUI- 41	6.8	54.6	56.8	35.4	NV
CUI- 42	21.2	42.6	69.9	57.4	21.3
CUI- 45	10.5	75.3	54.3	24.7	46.8

ND: No realizado. NV: No valorable.

Tabla 10. Expresión intracelular de HLA-G en las distintas subpoblaciones de células dendríticas (mieloides y plasmocitoides) de sangre de cordón umbilical.

MUESTRAS	CD1a+(CD14-)				
	TOTAL	CD11c + (%)		CD11c - (%)	
		TOTAL	HLA-G	TOTAL	HLA-G
CUI- 22	6.8	90.4	100	9.6	Nv
CUI- 23	2.4	85.7	77.4	14.3	52.9
CUI- 28	34.1	84.3	86.3	15.7	46.8
CUI- 35	16.4	82.5	69.9	27.5	42.3
CUI- 37	7.8	69.7	76.3	30.3	55.4
CUI- 41	5.6	59.7	69.8	40.3	38.8
CUI- 42	18.4	56.7	72.3	43.3	26.8
CUI- 45	12.4	71.2	61.4	28.8	55.6

ND: No realizado. NV: No valorable.

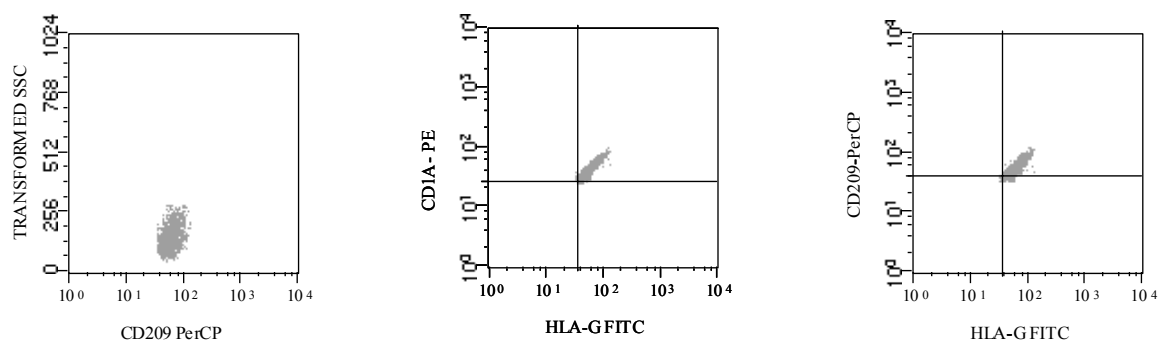
II.1.3 EXPRESIÓN INTRACELULAR Y SUPERFICIAL DE HLA-G EN CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS CD34+.

Se realizó la diferenciación a células dendríticas partiendo de células madre hematopoyéticas CD34+, utilizando factores de diferenciación: GM-CSF, TNF α y suero autólogo de cordón inactivado. Después de 14 días de cultivo se caracterizaron las muestras para los marcadores de células dendríticas, confirmando su diferenciación y se midió la presencia de HLA-G en estas células.

Los valores obtenidos son similares a los de las células dendríticas estudiadas (Figura 2). Está pendiente ampliar dichos ensayos de diferenciación para confirmar estos resultados y diferenciar células dendríticas de monocitos para su comparación²⁵².

Se determinó la expresión del marcador CD1a mediante citometría de flujo en las células dendríticas derivadas en cultivo, encontrándose presente en todos los casos. El nivel de expresión del HLA-G oscila entre 79,6% a 98%. (Figura 2).

Figura 2. Expresión de HLA-G en células dendríticas derivadas de células madre CD34+.



II.1.4 HLA-G SOLUBLE EN SUERO DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL.

El HLA-G soluble en suero de sangre de cordón umbilical se midió para establecer las posibles relaciones entre el inmunofenotipo, ARNm y las proteínas resultantes de las isoformas solubles.

Se obtuvieron 10 sueros de sangre de cordón, 3 pertenecientes a las muestras 2, 3 y 4 (Tabla 11), con el ARNm de las células mieloides y plasmocitoides obtenidos de la misma unidad de sangre de cordón. El resto fue aislado de diferentes unidades de sangre de cordón debido a la diferente cantidad de sangre obtenida. La pureza de los subconjuntos de las células dendríticas se evaluó mediante citometría de flujo según los marcadores y solo aquellos con un valor superior al 95% fueron utilizados.

Tabla 11. Isoformas y cuantificación soluble del HLA-G (IU/ml) en células dendríticas mieloides (MDC) y plasmocitoides (PDC) de la misma muestra de sangre de cordón umbilical.

Muestra simple	MDC	PDC	HLA-G soluble
01	G1,G5	G1	NT
02	G1,G5	G1	45.02
03	G1	G1,G2,G5	19.7
04	G1,G5	G1,G2,G5,G6	114.15

Las subpoblaciones dendríticas mieloides y plasmocitoides expresan isoformas G1 y G5. En la muestra 4 se expresa G5 en ambas subpoblaciones, siendo los valores mas altos de HLA-G (114,15 UI/ml) que en la muestra 2, que solo expresa G5 las células mieloides (45,02 UI/ml), y en la muestra 3, que solo la isoforma G5 se expresa en las células plasmocitoides (19,7 UI/ ml).

De las 13 muestras de células dendríticas aisladas, todas mostraron G1, 9 presentaban G5, 2 exhibían G2 y 2 exhibían G7. El HLA-G1 y G5 se encontraron en 6 de 13 mieloides; 2 fueron G1, G2 y G5; 3 eran solo G1 y 1 era G1, G5 y G7.

De las 11 muestras de células plasmocitoides, todas mostraron G1; 3 presentaban G5; 4 exhibían G2 y 2 presentaban G6.

En la Tabla 12 vemos las distintas isoformas HLA-G solubles en células mieloides y plasmocitoides obtenidas de diferentes unidades de sangre de cordón. En las muestras 9,11 y 15 (87,8-101,1 UI/ml), ambos subtipos presentan isoformas G5. En las muestras 6 y 18 (49,5-53,1 UI/ml) se expresa G5 solo en las células dendríticas, y en las muestras 7 y 17 (9,7-2,3 UI/ml), solo una baja expresión de G1 y falta la expresión de G5 en ambos isotipos celulares. Podría ser necesario aumentar el número de muestras para confirmar estos resultados.

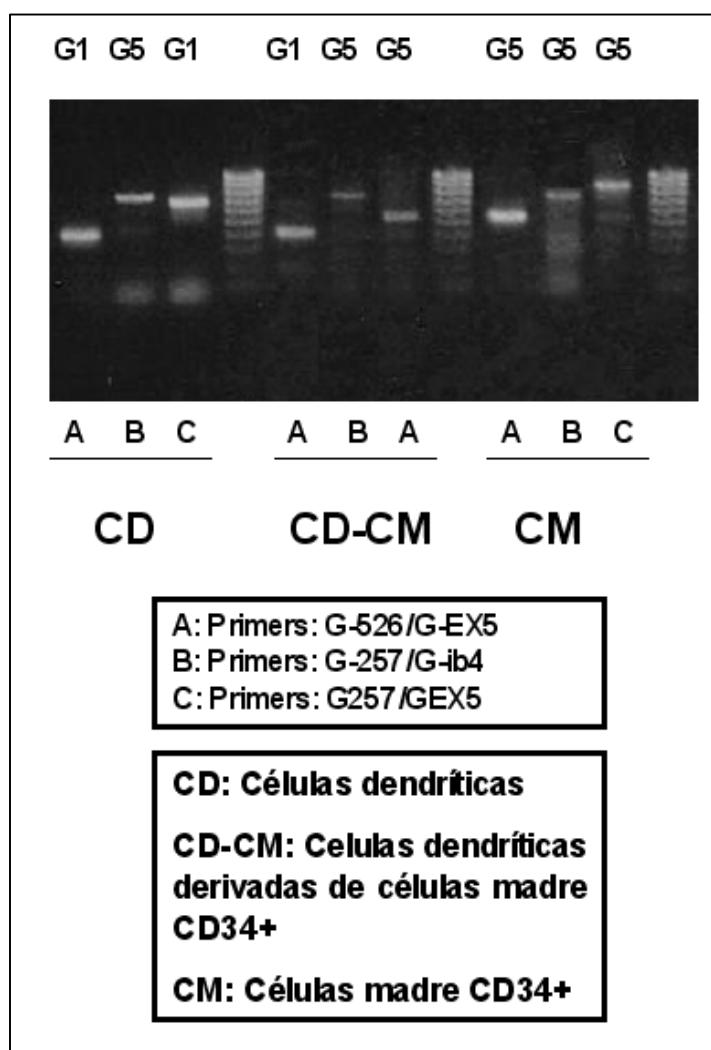
Tabla 12. Isoformas de HLA-G y cuantificación soluble (IU/ml) en células dendríticas mieloides (MDC) y células dendríticas plasmocitoides (PDC) de diferentes muestras de sangre de cordón umbilical.

Muestra simple	MDC	HLA-G soluble	Muestra Simple	PDC	HLA-G soluble
05	G1,G2,G5	NT	14	G1	NT
06	G1,G5	49.5	15	G1,G2,G5, G6	101.1
07	G1	9.7	16	G1,G2	NT
08	G1,G7	NT	17	G1	2.3
09	G1,G5,G7	87.9	18	G1	53.1
10	G1,G2,G5	NT	19	G1	NT
11	G1,G5	87.8	20	G1	NT
12	G1,G5	NT			
13	G1	NT			

II.2 EXPRESIÓN DE LAS DISTINTAS ISOFORMAS DE HLA-G EN SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL.

La Figura 3 señala la expresión génica de las isoformas G1 y G5 en células madre CD34+, en células dendríticas y en las células dendríticas derivadas de células madre del cordón umbilical en el laboratorio.

Figura 3. Expresión génica de G1 y G5 en células madre CD34+, células dendríticas y células dendríticas derivadas de células CD34+ de cordón umbilical.



II.2.1 EXPRESIÓN DE ISOFORMAS HLA-G EN CÉLULAS MADRE CD34+

Se aislaron células madre CD34+ por separación inmunomagnética, determinando el mRNA total de estas células y retrotranscripción (RT-PCR) con amplificación específica con los primers específicos de HLA-G.

Se observó la presencia de mRNA de HLA-G en células madre hematopoyéticas CD34+, aislando varias isoformas de esta molécula tanto en la superficie (G1) como en forma soluble (G5) (Figura 3).

II.2.2 EXPRESIÓN DE ISOFORMAS HLA-G EN CÉLULAS DENDRÍTICAS.

Se aislaron células dendríticas totales por separación inmunomagnética, con el proceso de retrotranscripción (RT-PCR) y amplificación específica con los primers específicos de HLA-G.

Se observó la presencia de mRNA de HLA-G en las células dendríticas. Existen varias isoformas de esta molécula tanto en superficie como en forma soluble. Se aisló las isoformas G1 que es la más completa y de superficie y la isoforma G5 que es la soluble.

Las isoformas de mRNA HLA-G G1 y G5 se encontraron en 7 de cada 10 células mieloides estudiadas, mientras que la isoforma G1 fué detectada en 3 células mieloides. En contraste, en las células plasmocitoides, las isoformas G1/G5 fueron encontradas en 3 de las 9 muestras analizadas y las otras 6 mostraron en subtipo G1. (Figura 3).

La Tabla 13 muestra la expresión de la proteína HLA-G en la superficie celular e intracelular en células dendríticas mieloides (MDC) y plasmocitoides (PDC) de sangre de cordón umbilical.

Todas las células dendríticas mieloides analizadas (n=10) expresan HLA-G en la superficie celular en un porcentaje de 64.56 \pm 6.96%, con un rango entre 54,3 a 71,6%. La expresión intracelular es más alta que en la superficie (73.15 \pm 7.22%) con un intervalo entre 86,3 a 61,4%. La expresión en la superficie de HLA-G fue aislada en todas las dendríticas plasmocitoides (n=8) con valores de 43.68 \pm 9.67% y una expresión entre 21,3 a 51,2%, mientras que la expresión intracelular (n=7) fue de 43.9 \pm 9.1% (Tabla 13). Es decir, la expresión intracelular fue mayor que la expresión en la superficie en la mayoría de las dendríticas, mientras que la mayoría de las plasmocitoides tuvieron valores similares.

Tabla 13. Expresión intracelular y de superficie de HLA-G en células dendríticas mieloides (MDC) y plasmocitoides (PDC).

Marcadores CD	CD1a+ (CD14-)				
	Total	Cd11c+(%)(MDC)		Cd11c-(%)(PDC)	
		Total	HLA-G	Total	HLA-G
Expresión sup. HLA-G (n=10).					
Media.	12.1 \pm 9.3	64.6 \pm 18.9	64.5 \pm 6.9	34.9 \pm 18.5	43.7 \pm 9.7
Rango.	1.7 – 36.2	31.7 – 99.2	54.3 – 71.6	0.8 – 68.3	21.3 – 51.2
Expresión intrac. HLA-G (N=8)					
Media	12.9 \pm 9.5	75 \pm 1.8	73.2 \pm 7.2	26.2 \pm 11.4	43.9 \pm 9.1
Rango	2.4 – 34.1	56.7 – 90.4	61.4 – 86.3	9.6 – 43.3	26.8 – 55.6

II.2.3 EXPRESIÓN DE ISOFORMAS HLA-G EN CÉLULAS DENDRÍTICAS GENERADAS EN EL LABORATORIO A PARTIR DE CÉLULAS CD34+.

La expresión de HLA-G en la superficie celular fue inducida en todos los casos de células dendríticas derivadas en cultivo a partir de células madre CD34+. Las isoformas G1 y G5 se encontraron en 2 de las 3 células dendríticas generadas, mientras que G1 solo se encontró en una célula (Figura 3). El nivel de expresión fue de 88,10% +/- 9,28% y oscila entre 79,6 a 98% de células positivas.

II.3 DESCRIPCION DE NUEVOS ALELOS HLA-G.

El locus del HLA-G presenta 16 proteínas diferentes y 49 alelos de DNA, lo que sugiere una presión evolutiva para mantener el polimorfismo bajo en proteínas. Se estudiaron 32 muestras de sangre de cordón umbilical. El ADN total fue extraído utilizando el Mini Kit (Qiagen, Crawley, Reino Unido) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y los productos HLA-G de la PCR y los plásmidos fueron secuenciados utilizando los mismos cebadores de amplificación específicos y purificados usando metodología ExoSAP-IT® (USB Corporation, Cleveland, OH) (Figura 4).

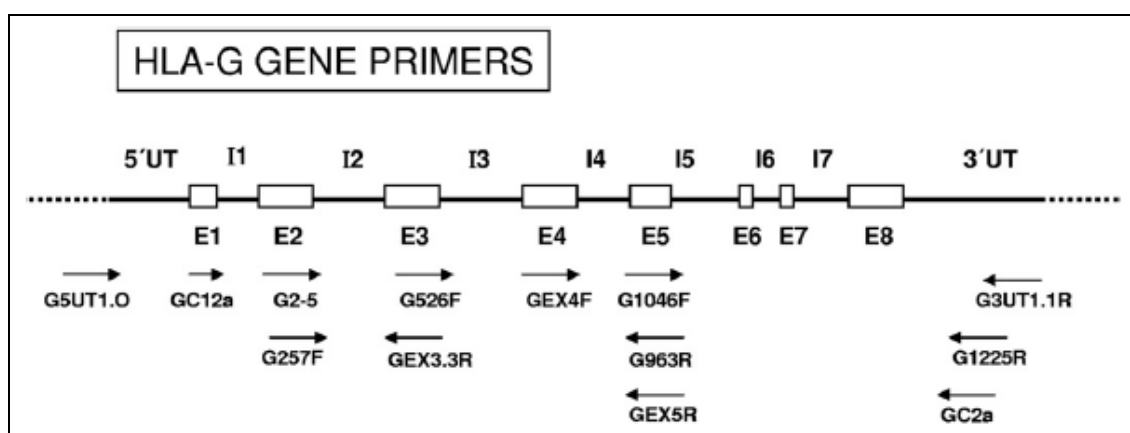


Figura 4. Diagrama que muestra la localización de los primers utilizados para la secuenciación de los alelos HLA-G.

- Un nuevo alelo HLA-G* 01010302 difiere de G*01010301 por un cambio de nucleótido en el intrón 5.

Un nuevo alelo HLA-G²⁵⁸ ha sido descrito en la población caucásica española tipificada en sangre del cordón umbilical como HLA-A*11, *34, HLA-B*15, *40, DRB1*15, *15, HLA-G*01010301, 01010302.

Los resultados muestran dos secuencias genómicas diferentes nombradas como HLA-G*01010301 (previamente HLA-G*010103) y una nueva secuencia llamada G*01010302 con un simple nucleótido cambiado en la posición 2519 (A→G) en el intrón 5 respecto al alelo *01010301.

Esta posición presenta un sistema dual A/G que divide los alelos HLA-G * en dos grupos diferentes:

1.- **El nucleótido A:** 01010101-01010105, 010106, 010109, 010112, 0103.

2.- **El nucleótido G:** G*01010201, G*01010202, 01010301, G*010401, G*010404, 0105N, 0106, 0107.

El nuevo alelo HLA-G*01010302 ha sido probablemente generado por evolución convergente más que por una mutación puntual al azar y difiere del alelo G* 01010301 por un cambio del nucleótido en el intrón 5.

- Nuevo alelo HLA-G*01010106 por cambios en el intrón 2.

Otro alelo HLA-G ha sido descrito en la población caucásica española tipificada como HLA-A*02, 0103; HLA-B*57, 57; HLA-G*01010101, 01010106. Este alelo es idéntico al HLA-G*01010105 a excepción de tres cambios de nucleótidos (posiciones: 482 T→C, 494 A→C y 531 G→C) y una inserción en el intrón 2 (C en posición 506). Estos cuatro nucleótidos son característicos del HLA-G* 01010201/02, *010109, *010401, *010404, *0105N, *0106 y *0107. Un evento de conversión génica en algunos alelos de esta secuencia de HLA-G* 01010105 podría haber generado el nuevo alelo HLA-G*01010106.

- Nuevo alelo HLA-G* 01:03:01:02 difiere de G*01:03:01:01 por una posible inversión en el intrón 3.

El nuevo alelo HLA-G²⁵⁷ ha sido descrito en la sangre del cordón umbilical de la población caucásica española:

1º tipado: HLA-A*25,*33; HLA-B*14,*15; DRB1*01,*07; HLA-G*01:03:01:02, 01:01:02:01.

2º tipado: HLA-A*01,*02; HLA-B*08,*41; DRB1*04,*13; HLA-G*01:03:01:02, *01:06.

Los resultados mostraron una nueva secuencia llamada G*01:03:01:02 con dos cambios en las posiciones 1313 (G→A) y 1314 (A→G) en el intrón 3 con respecto al alelo G*01:03:01.

El cambio en la posición 1313 no se describe anteriormente en cualquier alelo HLA-G*, mientras que en la posición 1314 hay un sistema dual A/G dividiendo el HLA-G en dos grupos diferentes:

1.- **El nucleótido A:** G*01:01:02:01, G*01:01:02:02, G*01:01:03:01, G*01:01:03:02, G*01:01:05, G*01:01:06, G*01:03, G*1:04:01, G*1:04:03, G*01:04:04, G*01:05N, G*01:06, G*01:07, G*01:08 y G*01:01:20.

2.- **El nucleótido G:** G*01:01:01:01 - 01:01:01:06, G*01:01:08, G*01:01:09, G*01:01:12, G*01:03:01.

La secuencia A/G en las posiciones 1313/1314 no está presente en ninguna molécula HLA clásica (-A, -B, -C) o no clásica (-E, -F), descartando la posibilidad de conversión génica o la evolución convergente como un mecanismo para generar este alelo. Este hecho apoya la hipótesis de una mutación de punto doble o más probablemente una inversión en las posiciones (GA → AG).

- Un nuevo alelo, HLA-G * 010120, es generado por recombinación entre los HLA-G*01010101/02 y HLA-G*01010201.

Se describe un nuevo alelo HLA-G²⁶⁰ como A*01, B*08, DRB1*03; G*010120, G*010404. La secuencia de este nuevo alelo es idéntica a la del grupo asesor *01010101/02 hasta la posición 705 (exón 3) y de la posición 706 (C→T), por lo que un evento de recombinación entre estos dos alelos podrían haber generado el nuevo alelo HLA-G*010120.

Los nombres de HLA-G*01010301 (HWS10006249 - FJ805838) y HLA-G*01010302 (HWS10006250 - FJ805839) fueron asignados oficialmente por el Comité de Nomenclatura de la Organización Mundial de la Salud en marzo de 1994 y mayo de 2009, respectivamente. El nombre de HLA-G*01010106 (HWS10005827 - FJ449755) fue asignado oficialmente por el Comité de Nomenclatura de la OMS en enero de 2009. El nombre de HLA-G*01:03:01:02 (HWS10012282 - HQ831444) ha sido asignado oficialmente por el Comité de Nomenclatura de la OMS en enero de 2011. El nombre de HLA-G*010120

(HWS10006896-GU070-582) fue asignado oficialmente por la Organización Mundial de la Salud y el Comité de Nomenclatura en octubre de 2009²⁴⁰. Todo sigue la política del Informe de Nomenclatura, en la cual los nombres serán asignados a nuevas secuencias a medida que se identifican.

II.4 CORRELACION DE LOS POLIMORFISMOS 14bp INDEL CON LOS ALELOS HLA-G

Se realizó secuenciación genómica de 32 muestras de sangre de cordón umbilical y 16 muestras de sangre materna periférica, tras aprobación del Comité de Ética del Hospital Clínico San Carlos. El HLA-G se obtiene por amplificación del PCR, que comprende una región de 3514 pares de bases (región 5'UT parcial, todos los intrones y exones y regiones 3'UT parcial, incluyendo 14 bp inserción/delección).

II.4.1 FILOGENIA HLA-G

Una secuenciación y estudio filogenético incluyendo intrones, exones y 14bp INDEL permite buscar el posible mecanismo evolutivo en la generación de los polimorfismos HLA-G²⁵⁶.

Se obtuvieron 16 diferentes alelos HLA-G. De estos, 9 eran secuencias de intrones y exones: HLA-G*01:01:01:01, *01:01:01:02, *01:01:01:05, *01:01:02:01, *01:01:03:01, *01:04:01, *01:04:04, *01:06 y *01:03; 4 eran

secuencias de exones: HLA-G*01:01:05, *01:01:08, *01:04:03 y *01:08; 3 eran nuevos alelos HLA-G*01:01:01:06, *01:01:03:02 y *01:01:20.

La secuencia completa de nucleótidos se analizó y se comparó con el resto de los alelos HLA-G. El número total de nucleótidos con variabilidad fueron de 74, y de ellos 37 estaban situados en los exones (13 con cambios no sinónimos) y 37 en intrones. Se observan tres patrones de secuencias comunes definiéndolos como la vía de evolución o linajes 1,2 y 3, y otros 4 menores (solo un alelo)²⁴⁸.

Esto linajes se basan en los nucleótidos característicos comunes en determinadas posiciones de la secuencia de intrones²⁴⁷. Dos mecanismos están basados en la generación de los linajes (intrones): la conversión génica y la evolución convergente, siguiendo patrones específicos (Figura 5).

- **Linaje 1:** estos grupos de linaje son alelos G*01:01:01:01-06, *01:01:08 y *01:01:09. Hay 8 posiciones con nucleótidos específicos de linaje: T-147, T-482, A-494, T-1019, T-1314, A-1552, A-2074, G-2084. Todos los alelos secuenciados con el polimorfismo 14bp mostraron la presencia de la delección que confirma la homogeneidad de este linaje. El resto de los alelos, excepto el *01:04:01, pertenecen al promotor linaje 1. Este linaje se podría dividir en dos grupos basados en la presencia de un nucleótido C o T en la posición 1147 del intrón 3. Uno de ellos está formado por los alelos *01:01:01:01-02 y el otro

grupo por los alelos *01:01:01:03-06, y *01:01:08, 01:01:09, por mecanismos de conversión génica y evolución convergente.

- **Linaje 2:** este linaje está compuesto por los alelos G*01:01:02:01-02, *01:05N, *01:06, *01:01:12, *01:08, *01:01:03:01-02, *01:01:05, *1:07, *01:04:01 y *01:01:04:03-04, con 16 posiciones con nucleótidos específicos de linaje: A-201, C-505b, C-531, A-615, A- 685, C-1064, G-1217, A-1365, C-1932, C-2161, C-2278, T-2312, G-2330, A-2418 y G-2599 .

Teniendo en cuenta los alelos de los polimorfismos 14 bp, los intrones y exones, se consideran dos sublinajes:

Sublinaje 2A: comprende los alelos HLA-G*01:01:02:01-02, *01:05N, *01:06, *01:01:12, *01:08, *01:01:03:01-02 y *01:01:05. Se caracterizan por la presencia de C/T en la posición 706, A/T en la posición 748 y C en la posición 755, ausencia de la supresión 14bp (en los alelos secuenciados) y los alelos pertenecen al linaje 2. Estos alelos se han generado por mutación puntual.

Sublinaje 2B: pertenecen los alelos HLA-G*01:07, *01:04:01, *01:04:03, *01:04:04 y se caracterizan por la presencia de C en la posición 706, A en la posición 748 y A en posición 755, presencia de la supresión 14 bp (en los alelos secuenciados) y los alelos descritos pertenecen al linaje 1. Estos alelos son generados por los mecanismos de conversión génica y evolución convergente.

- **Linaje 3:** este linaje contiene los alelos HLA-G*1:03 y *01:01:06 con 6 posiciones de nucleótidos específicos de linaje: T-485, A-507, T-644, T- 1054, C-1534, y T-1590. Los alelos se generan a partir de mecanismos de eventos de conversión génica y evolución convergente. Se caracterizan por la ausencia del polimorfismo 14 bp supresión (en los alelos secuenciados) y con alelos descritos del linaje 2.

Los alelos con intrones no secuenciados del linaje 1 serían HLA-G*01:01:11, *01:01:15, *01:02, *01:10 y *1:01:04. Del linaje 2A serían *01:01:07, *01:01:14, *01:01:16-19, *01:09, *01:01:13, *01:13N y *01:16 y del linaje 2B serían *01:04:05, *01:15 y *01:11. Esta hipótesis podría ser confirmada secuenciando los intrones y el 14bp inserción/delección.

- **Otros linajes o grupos evolutivos:** hay varios alelos (HLA-G*01:14, *01:12, *1:04:02 y *1:01:20) que no siguen los patrones de los linajes comentados pero tienen una composición específica, incluso en la ausencia de secuencias de intrones. Estos alelos podrían considerarse pertenecientes a los linajes menores o recién establecidos pero se generan a partir de los tres linajes principales.

- **G*01:14:** los exones 2 y 4 de este alelo vienen del linaje 2, y comparte el nucleótido T en la posición 1799 (exón 4) de los alelos *1:16 y *1:06; y el exón 3 del linaje 1. El mecanismo para generar este alelo podría ser un evento de conversión génica incluyendo el exón 2 completo donde el alelo donante sería

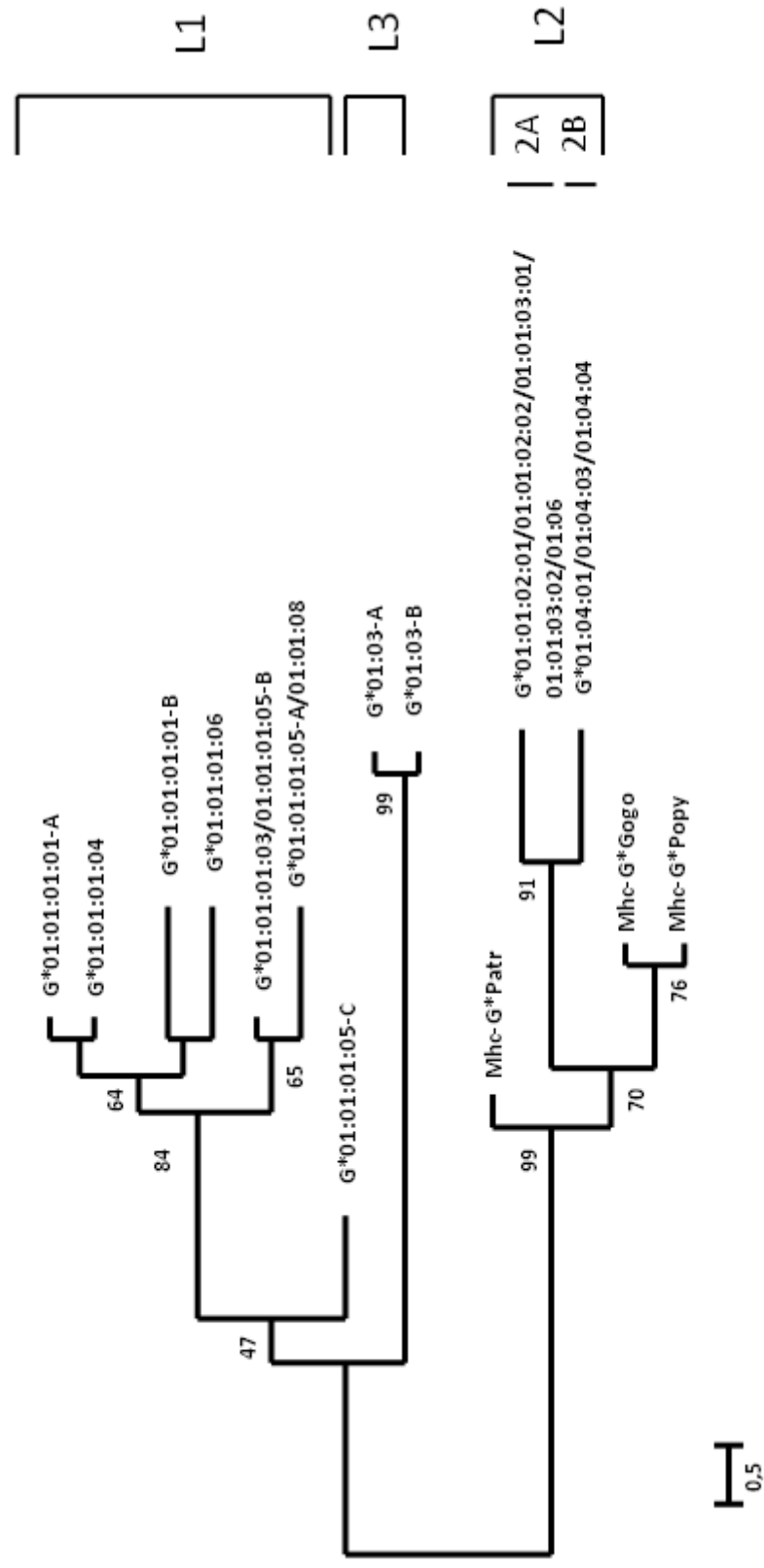
algunos de los del linaje 1 y el receptor podría ser uno de los dos alelos mencionados anteriormente.

- *HLA-G*01:12*: el exón 2 pertenece al linaje 2, y los exones 3 y 4 al linaje 1, por lo tanto, este alelo podría haber sido generado por un evento de recombinación entre los dos alelos de cada linaje que implica el intrón 2 como una región de reticulación.

- *HLA-G*01:04:02*: el exón 2 y 3 con los alelos del linaje 2 y el exón 4 con los alelos del linaje 3, por lo tanto, un evento de recombinación entre alelos de ambos linajes podrían establecerse como un mecanismo evolutivo para originar este alelo.

- *HLA-G*01:01:20*: este alelo se ha descrito con la secuencia completa, por lo tanto, su generación es clara y está formado por un evento de recombinación en el que las regiones 5'UT, el exón 1, intrón 1, el exón 2 y el intrón 2 se comparten con los de *G*01:01:01:01-02*, y la secuencia desde el exón 3 hasta el final pertenece al alelo *G*01:01:02:01*.

Figura 5. Vías de evolución de los linajes de alelos HLA-G.



DISCUSIÓN

DISCUSION

I. EXPRESIÓN DE HLA-G EN CÉLULAS MADRE CD34+

En cuanto a la expresión de HLA-G en células madre CD34+, se deduce que el marcador CD38+, que aparece en estadios más maduros de la célula madre hematopoyética, se encuentra ausente en la población CD34+/CD133-, dando una posible confirmación a la teoría de que el marcador CD34+ sería reflejo de una célula madre más inmadura. Se expresa menos HLA-G en las células CD34+/CD133+ ya que es una célula más primitiva.

La molécula CD133+ parece caracterizar precursores hematopoyéticos más inmaduros o primitivos. Podría ser una alternativa a CD34+ respecto a la selección de células madre y su expansión.

Los porcentajes de HLA-G son más elevados en la expresión intracelular de las células madre CD34+, lo que indica la presencia de dicha proteína en el interior de la célula y una producción activa. Es probable la presencia de las isoformas G1 y G5 intracelularmente, ya que en la superficie sólo se puede detectar G1.

Respecto a la expresión de HLA-G en la superficie de los tres subtipos de células madre hematopoyéticas que además son CD1a positivos, se confirma que va asociada con la expresión de CD1a, de modo que aquellas células madre que no son CD1a no expresan HLA-G.

II. EXPRESIÓN DE HLA-G EN CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las células dendríticas son las células presentadoras de antígeno más potentes, con una capacidad única de inducir una respuesta inmune primaria y son responsables de presentar antígenos a las NK y linfocitos T CD8+ citotóxicos. Constituyen una población heterogénea de células hematopoyéticas con dos tipos: células mieloides y plasmacitoides.

Ambos subtipos derivan de las células madre CD34+ en función de dos vías de diferenciación. La mioide se diferencia al linaje monocitos-macrófagos y requieren la presencia del factor estimulante de colonias de granulocitos (GM-CSF). Las células plasmacitoides están presentes en sangre periférica humana, en los tejidos linfoides y corresponden al linaje CD11c, CD4+ y CD45RA. Son positivas para CD303 (BDCA2) y CD304 (BDCA4).

Los resultados obtenidos nos indican las diferencias entre las subpoblaciones de células dendríticas mieloides y plasmacitoides y la expresión de HLA-G. Se definió la presencia de HLA-G pero en asociación a la expresión del marcador CD1a. La isoforma G5 soluble podría ser más importante de manera funcional en las células mieloides que en las plasmacitoides. La expresión intracelular de HLA-G fue mayor que en la superficie de la mayoría de las células mieloides, mientras que en las células plasmacitoides era similar la expresión intracelular y de superficie. Los isotipos G2, G6 y G7 confieren un rol en condiciones fisiológicas en la defensa materno-fetal.

La mayoría de las células mieloides expresan G1 y G5, mientras que las células plasmacitoides expresan principalmente G1. Esto explica la diferencia de expresión en la superficie celular e intracelular de HLA-G, ya que el anticuerpo monoclonal utilizado reconoce solo isoformas G1 en la superficie y G5 intracelular. Las isoformas G2, G3 y G4 se producen intracelularmente, se sequestran en el retículo endoplasmático y no se expresa en la superficie. Esta expresión diferencial del HLA-G en células mieloides y plasmacitoides de sangre de cordón umbilical contribuye a la idea de que los dos subtipos de células dendríticas tienen funciones y fenotipos distintos.

El comportamiento del sistema inmune en sangre periférica de adulto y en cordón umbilical es diferente. Las células dendríticas de sangre periférica de adulto presenta una débil actividad transcripcional HLA-G en mieloides y plasmacitoides y no hay expresión en la superficie celular de ningún isotipo de HLA-G, cualquiera que sea su maduración en la sangre periférica. Permiten la defensa contra antígenos externos, iniciando la respuesta inmune con la activación de las células T. Las células dendríticas del cordón muestran una baja capacidad aloestimuladora, y puede ser debido a la alta expresión de HLA-G, induciendo tolerancia, para impedir los fenómenos de rechazo materno-fetal.

El trasplante de células madre del cordón umbilical presenta una menor incidencia y severidad de la enfermedad de injerto contra huésped. Ocurre por una multitud de factores inmunológicos, y ahora se puede incluir la presencia

de isoformas HLA-G expresados por las células madre CD34+ y las células dendríticas. El HLA-G inhibe la capacidad de respuesta allogénica en la proliferación de células T y NK y depende de las citoquinas del medio ambiente, por lo que se puede modificar la expresión de estas células.

Podemos inducir la presencia de HLA-G en células dendríticas de sangre de cordón con la administración de citoquinas, como la IL-10. Esta característica podría ser aplicada en inmunoterapia celular, en patologías que requieran una respuesta inmune controlada.

III. EXPRESIÓN DE HLA-G EN CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE CÉLULAS CD34+.

Se consiguió la diferenciación “in vitro” de células madre CD34+ de sangre de cordón umbilical a células dendríticas siendo éstas de fenotipo mieloide, con alta expresión del marcador CD1a+ y con expresión en superficie e intracelular de HLA-G.

Esto contrasta con lo descrito utilizando células madre CD34+ de sangre periférica de adulto, ya que la expresión de ambos marcadores es menor. Estos resultados muestran la posibilidad de obtener células dendríticas con una alta expresión de HLA-G en la superficie con las principales isoformas funcionales, G1 y G5, más que el obtenido para las células dendríticas derivadas a partir de sangre periférica de adulto.

Se encontró una expresión diferencial de CD1d en la subpoblación de células madre CD34-/CD133+ respecto a los demás grupos y una expresión de CD1a en las que expresaban a su vez HLA-G. Estos marcadores se han definido por primera vez en estas poblaciones y serán objeto de estudios posteriores.

La molécula CD1d es un miembro de la familia CD1 de la β 2-microglobulina. Su expresión es elevada, sobretodo en subpoblaciones CD34+ y en las células dendríticas derivadas de células madre que son células presentadoras de antígeno. Las células dendríticas presentan el CD1d a las células NK para producir grandes cantidades de INF γ (activación) e IL-4 (inhibición) en presencia de IL-12, sugiriendo una función reguladora en las primeras fases de la respuesta inmune y polarizando la respuesta inmune vía TH1 y TH2.

En el caso de las células madre CD34-/CD133+ se encuentran valores elevados de expresión de CD1d. Esto podría indicar que se está generando un posible subtipo de células dendríticas o un paso intermedio en la ontogenia de algún determinado subtipo de estas células. La presencia de CD14+ y CD11c+ indica un estado inmaduro y podría corresponder con la línea de derivación de los monocitos.

La expresión intracelular de CD1d en las distintas subpoblaciones CD1a+ es muy elevada. Las células CD34+/CD133- tienen una expresión intracelular muy pequeña indicando una producción muy baja. Esto podría ser explicado por una mayor inmadurez de estas células.

IV. DISTRIBUCIÓN DE DISTINTAS ISOFORMAS DE HLA-G.

HLA-G es una molécula clase I no clásica (clase Ib) del complejo mayor de histocompatibilidad humano que adopta 7 isoformas, resultado del empalme alternativo de un mismo mRNA inmaduro. Cuatro isoformas se encuentran ligadas a la membrana (HLA G1, G2, G3, G4), y las otras tres formas son solubles (HLA G5, G6, G7). Esta molécula presenta un limitado polimorfismo y baja restricción de la expresión en la superficie celular.

La sangre de cordón umbilical tiene un comportamiento inmune diferente que la sangre periférica de adulto. Existe un menor efecto de la enfermedad injerto contra huésped en sangre de cordón ya que la sangre periférica de adulto presenta un patrón limitado de isoformas HLA-G.

La distribución de las distintas isoformas de HLA-G señala las diferencias entre las subpoblaciones de células dendríticas mieloides y plasmacitoides y reflejan una funcionalidad diferente en los dos grupos.

En este trabajo se determinó el patrón de expresión de los distintos transcritos de HLA-G en células madre hematopoyéticas (G1 y G5), en células dendríticas derivadas de células madre (G1 y G5) y en células dendríticas (G1, G2, G5, G6 y G7).

La mayoría de las células mieloides expresan isoformas HLA-G1 y G5, mientras que las células plasmacitoides expresan G1. Sólo las isoformas HLA-G (G1 y G5) se utilizaron para el análisis de citometría de flujo. El resto de las isoformas no pudieron ser detectadas ya que el HLA-G2, G3, y G4 se produce intracelularmente, son secuestradas en el retículo endoplásmico y no llegan a la superficie de la célula. Esas isoformas podrían conferir un papel importante para la inmunotolerancia materno-fetal.

La isoforma G7 se informa por primera vez en las células dendríticas mieloides de sangre de cordón y no en la muestra de células plasmacitoides. La transcripción de esta isoforma se había detectado previamente a niveles elevados en el trofoblasto en el primer trimestre, la placenta a término, la membrana amniótica y el timo, estando ausente en hígado fetal. Esto indica una posible función en la tolerancia materno-fetal.

La isoforma G2 se aisló tanto en células mieloides como en plasmacitoides, mientras que la G6 solo se encontró en células plasmacitoides. Las proteínas G2 y G6 se presentan en el citotrofoblasto extraveloso y la membrana del corion. G3 y G4 no estaban presentes en la muestra estudiada. En conclusión, HLA-G1 y al menos una isoforma soluble están presentes en las células mieloides, y las células plasmocitoides puede presentar un mayor número de isoformas (hasta cuatro), reflejando un posible papel en la funcionalidad de estas células.

Los fenotipos de HLA-G están relacionados con una menor incidencia y gravedad de la enfermedad injerto contra huésped tras un trasplante. Diversos estudios han demostrado la presencia de HLA-G soluble en el injerto y el suero de los trasplantados cardíacos que tienen menos fenómenos de inmunorechazo y mejor tolerancia del órgano. Además, la expresión de HLA-G en células mieloides puede tener una función inmunoreguladora con las células NK y células T.

La expresión de HLA-G (isoformas G1 y G5) fue inducida en todos los casos de células dendríticas derivadas en cultivo en el laboratorio. Esto nos permite obtener células dendríticas con alta expresión de HLA-G, inclusive mucho mayor que las derivadas de células madre CD34+ de sangre periférica del adulto. Además su expresión podría ser activada durante los xenotrasplantes por citoquinas (IL-10). Estas características pueden ser aplicadas a la inmunoterapia celular en patologías donde se necesite una inmunorregulación.

V. FILOGENIA Y DESCRIPCION DE NUEVOS ALELOS HLA-G

Se han descrito 3 nuevos alelos HLA-G que han sido generados por mecanismos de evolución convergente, conversión génica y mutaciones puntuales. El gran polimorfismo se genera por la función de estas proteínas en la creación de un repertorio más amplio en la respuesta inmune.

Estos alelos confirman que las fuerzas evolutivas para generar el polimorfismo HLA-G se llevan a cabo para evitar nuevas proteínas con mecanismos evolutivos específicos. Estos eventos pueden estar relacionados con la función de esta molécula como un tolerógeno en el trasplante y el rechazo del feto, probablemente a través de las interacciones con los linfocitos NK y T.

VI. POLIMORFISMO 14bp INDEL Y SU RELACION CON LOS ALELOS HLA-G

Los alelos HLA clase I han generado un gran polimorfismo debido a la función de esas proteínas en la creación de un repertorio más amplio en la respuesta inmune. Por el contrario, el locus HLA-G no clásico tiene un polimorfismo limitado porque su función es tolerogénica, y la evolución funciona para evitar cambios (menor número de diferentes proteínas HLA-G) para mantener la función inmune.

Los alelos HLA-G siguen un patrón diferente en la generación de polimorfismos, y ocurren por mutaciones puntuales al azar de los exones. Sin embargo, el mantenimiento de los polimorfismos podría tener una evolución vía específica en función de las regiones no codificantes como los intrones, la supresión/inserción de 14bp (exón 8) o las regiones promotoras.

Se han descrito 3 linajes de alelos HLA-G que se han asociado a la presencia/ausencia del fragmento de 14bp de la región 3'UT. Los alelos secuenciados del polimorfismo 14bp inserción/delección están fuertemente

vinculados al linaje 1. La ausencia del 14 bp se relaciona con el linaje 2. Además, el linaje 1 y 2B siempre se asocia con la presencia de la supresión 14bp y el linaje 2 y 3 con la ausencia de la supresión 14bp. La secuenciación de estas regiones en el resto de los alelos HLA-G podría ser necesaria para establecer la evolución de los alelos HLA-G en los seres humanos.

El estudio del polimorfismo en las regiones HLA-G no codificantes es muy informativo para la realización de análisis evolutivos y para explicar la actividad y la presencia de diferentes isoformas de HLA-G y sus niveles como se indican por las regiones promotoras y los polimorfismos inserción/delección 14bp. El polimorfismo 14bp INDEL en la región 3'UT influye en la estabilidad del ARNm.

La mayoría de los cambios de los nucleótidos parece ser generada principalmente mediante conversión génica y/o evolución convergente en los intrones que mantienen sustituciones duales en las posiciones correspondientes a preservar los linajes evolutivos. Otros alelos sólo se han generado en el extremo de la vía evolutiva por mutaciones puntuales aleatorias en los exones que producen cambios no productivos, pequeños cambios en la estructura proteica y alelos nulos. Las proteínas resultantes tienen una estructura muy conservadora en relación a los alelos HLA-G clase I clásicos, para su función tolerogénica. Estos estudios sobre la estructura genética de los locus HLA-G podrían dar nuevas explicaciones sobre su función inmune.

Serán necesarios más estudios sobre los alelos polimórficos de HLA-G en diferentes poblaciones o áreas geográficas determinadas, con el fin de formular la hipótesis del origen de los linajes descritos.

VII. APLICACIONES EN INMUNOTERAPIA CELULAR

Se han encontrado características especiales en las células madre hematopoyéticas (expresión de moléculas HLA-G y CD1d), células dendríticas mieloides y plasmacitoides (expresión diferencial de HLA-G), en las células CD34-/CD133+ (elevada expresión de CD1d) y en la sobreexpresión de CD1d en células dendríticas derivadas de monocitos utilizando suero autólogo de sangre de cordón umbilical. Estas características, en todos los casos, son específicas de la sangre de cordón umbilical y no en sangre periférica de adultos. Esto indica la presencia de dos moléculas implicadas directamente en la regulación de la respuesta inmune (HLA-G, inhibición de la respuesta NK y CD1d, regulación vía NKT).

Las células dendríticas del cordón umbilical expresan HLA-G que permiten defender al feto del ataque de las células NK y linfocitos T citotóxicos. Además, las células mieloides y los macrófagos expresan moléculas HLA-G en enfermedades tumorales, inflamatorias, células infectadas por virus y tejidos trasplantados. Estas características se pueden aplicar a la inmunoterapia celular en patologías donde es necesaria la inmunorregulación, para mejorar la fertilidad, el mantenimiento del embarazo y el trasplante de órganos, un mejor

entendimiento de la aparición del HLA-G en tumores estromales y las implicaciones de su expresión.

Los alelos HLA-G y los niveles de expresión de las proteínas y ARNm se asocian con algunas patologías de la gestación, tales como las infecciones intrauterinas, la preeclampsia, los abortos de repetición y los fallos de implantación en reproducción asistida. Además se expresa patológicamente en tejidos trasplantados, tumores, inflamaciones e infecciones virales. Los estudios van dirigidos a controlar mejor las interacciones HLA-G/NK en la inducción de un estado de tolerancia inmunitaria.

La utilidad práctica se basa en todas las aplicaciones que se pueden obtener de la modulación de la respuesta inmune como la terapia celular en enfermedades de carácter autoinmune, hipersensibilidad, coadyuvante de vacunas, tratamiento de rechazo de trasplantes, procesos neoplásicos, en general, el campo de las futuras terapias es muy amplio. Por otra parte, la utilización de células madre de cordón es mayor debido a su plasticidad y potencialidad que la de médula ósea y de sangre periférica. Además, utilizaría un tejido que es base de los bancos de donación y cuya compatibilidad no necesita ser tan absoluta.

Por otra parte, el número de las células madres es uno de los factores limitantes de los bancos de sangre de cordón umbilical ya que actualmente es sólo aplicable a niños (el número necesario de células madre para el éxito del

trasplante se corresponde con el de Kg. del receptor) y además, una vez usado es irrecuperable. La expansión de este tipo de células aumentaría las posibilidades de poder utilizar el mismo donante tanto para adultos como para distintos receptores de un mismo tipo.

Se sigue estudiando con ensayos controlados para determinar la importancia del HLA-G en caso de la inmunorregulación en el trasplante de sangre de cordón. El HLA-G podría ser activado con la utilización de citoquinas (IL-10) antes del xenotrasplante, e inducir su máxima expresión para evitar fenómenos de rechazo. Por otra parte, existen tumores que expresan HLA-G, lo que permite a los mismos escapar del sistema inmunitario. Disminuyendo su expresión con hormonas o anticuerpos se podría favorecer la respuesta antitumoral y limitar la proliferación maligna.

Más allá de los conocimientos actuales sobre las funciones de la inmunotolerancia del HLA-G, los trabajos deben ir dirigidos sobre la interacción con células NK en la inducción de un estado de regulación inmunitaria y lograr la forma de modular la expresión del HLA-G.

Gracias al conocimiento de la inmunología de la gestación es posible llegar a entender los procesos de adaptación inmunológicos y desarrollar alternativas para la manipulación de la respuesta inmune, como el campo de la obstetricia,

vacunación, oncología, trasplante de órganos, trastornos inflamatorios y medicamentos inmunosupresores.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- Se observó la expresión de HLA-G en células dendríticas mieloides y plasmacitoides tanto en la superficie como intracelularmente, ésta última en mayor porcentaje. Respecto a los tres grupos de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical se definió la presencia de HLA-G pero en asociación a la expresión de CD1a. También se encontró la expresión de HLA-G soluble en la sangre de cordón umbilical.
- 2.- Se consiguió la diferenciación “in vitro” de células madre hematopoyéticas y monocitos a células dendríticas siendo éstas de fenotipo mieloide y con expresión en superficie e intracelular de HLA-G.
- 3.- Se determinó el patrón de expresión de los distintos transcritos de HLA-G en células madre hematopoyéticas (G1 y G5), en células dendríticas derivadas de células madre (G1 y G5) y en células dendríticas (G1, G2, G5, G6 y G7).
- 4.- Se han descrito 3 alelos nuevos de HLA-G que han sido generados por mecanismos de evolución convergente, conversión génica y mutaciones puntuales.
- 5.- Se han descrito 3 linajes de alelos HLA-G que se han asociado a la presencia/ausencia del fragmento de 14bp de la región 3'UT.

6.- Se han encontrado características especiales en las células madre hematopoyéticas (expresión de moléculas HLA-G y CD1d), células dendríticas mieloides y plasmacitoides (expresión diferencial de HLA-G), en las células CD34-/CD133+ (elevada expresión de CD1d) y en la sobre expresión de CD1d en células dendríticas derivadas de monocitos utilizando suero autólogo de sangre de cordón umbilical. Estas características, en todos los casos, son específicas de la sangre de cordón umbilical y no en sangre periférica de adultos. Esto indica la presencia de dos moléculas implicadas directamente en la regulación de la respuesta inmune (HLA-G, inhibición de la respuesta NK y CD1d, regulación vía NKT).

7.- Se encontró una expresión diferencial de CD1d en la subpoblación de células madre CD34-/CD133+ respecto a los demás grupos y una expresión de CD1a en las que expresaban a su vez HLA-G. Estos marcadores se han definido por primera vez en estas poblaciones y serán objeto de estudios posteriores.

ANEXO



CONSENTIMIENTO INFORMADO (DONACIÓN DE SANGRE PERIFÉRICA DE MADRES EMBARAZADAS PARA FINES DE INVESTIGACIÓN) (ANEXO 1)

La abajo firmante _____ con
DNI/Pasaporte número _____ y en pleno uso de mis facultades psíquicas
declaro que:

- Entiendo que la sangre donada será utilizada para fines exclusivos de investigación.
- Entiendo que la información referente a mí y a mi hijo será codificada y tratada confidencialmente, de manera que queden protegidas nuestras identidades.
- Entiendo que cualquier resultado patológico detectado en la analítica me será comunicado por el médico responsable.
- Entiendo que mi consentimiento no obliga al Hospital a recoger la sangre si se considera que las circunstancias no son las adecuadas.
- Entiendo que en ningún momento se realizará manipulación genética alguna de la sangre obtenida (mutación dirigida, clonación, etc...)
- Doy mi consentimiento porque, en caso de que la sangre recogida no sea la adecuada para los objetivos definidos, sea desechada.
- Entiendo que la donación es altruista, y que no se derivará ninguna compensación económica.
- Tengo la posibilidad de renunciar a este consentimiento hasta la toma de la muestra.
- Entiendo que la investigación a realizar respeta los principios fundamentales de la Declaración de Helsinki, del convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y la biomedicina, de la Declaración Universal de la UNESCO sobre el genoma humano y los derechos humanos, y del Convenio para la protección de los derechos humanos y la dignidad del ser humano con respecto a las aplicaciones de la Biología y la Medicina (Convenio de Oviedo relativo a los derechos humanos y la biomedicina). Además, se cumplirá la legislación vigente y otras normas reguladoras, pertinentes a la investigación en materia de ética, experimentación humana o bioseguridad.
- He recibido y leído toda la información dada y estoy de acuerdo; he podido hacer todas las preguntas que he considerado convenientes y me han aclarado todas las dudas.

En consecuencia, doy mi consentimiento para la donación de sangre con finalidad exclusiva en investigación.

Fdo: _____

Facultativo de Ginecología

Fdo: _____

Donante



CONSENTIMIENTO INFORMADO (DONACIÓN DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL PARA FINES DE INVESTIGACIÓN) (ANEXO 2)

La abajo firmante _____ con
DNI/Pasaporte número _____ y en pleno uso de mis facultades psíquicas
declaro que:

- Entiendo que la sangre de cordón umbilical donada será utilizada para fines exclusivos de investigación.
- Entiendo que la información referente a mí y a mi hijo será codificada y tratada confidencialmente, de manera que queden protegidas nuestras identidades.
- Entiendo que cualquier resultado patológico detectado en la analítica me será comunicado por el médico responsable.
- Entiendo que mi consentimiento no obliga al Hospital a recoger la sangre del cordón umbilical, si se considera que las circunstancias no son las adecuadas.
- Entiendo que en ningún momento se realizará manipulación genética alguna de la sangre obtenida (mutación dirigida, clonación, etc...)
- Doy mi consentimiento porque, en caso de que la sangre recogida no sea la adecuada para los objetivos definidos, sea desechada.
- Entiendo que la donación es altruista, y que no se derivará ninguna compensación económica.
- Entiendo que por el presente consentimiento renuncio a tener acceso a las células progenitoras de la sangre de cordón umbilical ya que en la mayoría de los casos se agotarán en los experimentos correspondientes.
- Tengo la posibilidad de renunciar a este consentimiento hasta el nacimiento de mi hijo.
- Entiendo que la investigación a realizar respeta los principios fundamentales de la Declaración de Helsinki, del convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y la biomedicina, de la Declaración Universal de la UNESCO sobre el genoma humano y los derechos humanos, y del Convenio para la protección de los derechos humanos y la dignidad del ser humano con respecto a las aplicaciones de la Biología y la Medicina (Convenio de Oviedo relativo a los derechos humanos y la biomedicina). Además, se cumplirá la legislación vigente y otras normas reguladoras, pertinentes a la investigación en materia de ética, experimentación humana o bioseguridad.
- He recibido y leído toda la información dada y estoy de acuerdo; he podido hacer todas las preguntas que he considerado convenientes y me han aclarado todas las dudas. En consecuencia, doy mi consentimiento para la donación de sangre del cordón umbilical con finalidad exclusiva en investigación.

Fdo: _____

Fdo: _____



HOJA DE INFORMACIÓN SOBRE LA DONACIÓN DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL PARA FINES DE INVESTIGACIÓN (ANEXO 3)

FINALIDAD DEL PRESENTE ESTUDIO

Como resultado del esfuerzo de la creación y coordinación de un equipo multidisciplinar que incluye las instituciones del Instituto de Salud Carlos III y del Hospital Clínico de San Carlos de Madrid, se ha puesto en marcha una línea de investigación desde el año 2005 aprobada y financiada por el Ministerio de Sanidad (Proyectos CP04/0026; PI05/338 y MPY1180/06) y que se continúa en el proyecto titulado: “Modulación de la respuesta inmune mediante el uso de células madre y dendríticas de cordón umbilical, sangre periférica y eritrocitos nucleados fetales. Su aplicación al trasplante de órgano sólido y tejidos” cuyo investigador principal es el Dr. Jorge Martínez Laso, Jefe de la Unidad de Inmunoterapia celular del Instituto de Salud Carlos III (Campus de Majadahonda, Tfno: 918223715, e-mail: jmlaso@isciii.es) con fondos de la Fundación Mutua Madrileña con el objetivo del uso de la sangre del cordón umbilical para terapias de regeneración celular inmunológica a partir de células madre.

INFORMACIÓN GENERAL

Después del nacimiento, el cordón umbilical y la sangre que contiene son desechados. Esta sangre contiene gran cantidad de células especializadas en la renovación permanente de las células de la sangre que pueden ser usadas para uso terapéutico o de investigación.

Interés terapéutico de la sangre de cordón:

Todos los años, miles de personas desarrollan una enfermedad grave de la médula ósea o nacen con alteraciones genéticas de la misma que comprometen su capacidad de vida. Para ellos, la única vía de curación pasa por un trasplante de médula ósea. La tasa máxima de éxito se produce cuando el donante de médula ósea es compatible con el paciente. Ese donante se busca habitualmente entre los hermanos del paciente, o a partir de una lista de donantes voluntarios. Lamentablemente, sólo un 30% de los casos encuentran un donante compatible.

La realización de un trasplante de médula ósea incompatible comporta riesgos muy importantes para el paciente. Sin embargo, las células de la sangre del

cordón umbilical dada su inmadurez, permiten la realización de trasplantes no totalmente compatibles con menor riesgo para el paciente. Todo ello facilita el que un mayor número de pacientes se beneficien de la posibilidad de un trasplante.

La ventaja adicional de la sangre del cordón es que se puede disponer de ella en un Banco de Cordón, lo que facilita que le pueda ser trasplantada inmediatamente, evitando retrasos innecesarios.

Interés con fines de investigación

Dentro de las células precursoras o “células madre” existen dos grandes grupos en términos generales las mesenquimales y las hematopoyéticas. Las primeras tienen la capacidad potencialmente de generar cualquier tipo de tejido no hematopoyético (células epiteliales, neuronales, beta-pancreáticas) y las segundas como indica su nombre pueden potencialmente generar cualquier tipo de células de la serie llamada blanca (monocitos, células dendríticas) indispensables para la respuesta inmune frente al ataque de infecciones.

Procedimiento de la donación de la sangre del cordón umbilical

La sangre del cordón umbilical se recoge después del nacimiento del niño y tras la sección del cordón umbilical. Para ello, se realiza una simple punción del cordón umbilical mientras que se produce la salida de la placenta o una vez fuera del útero. Sepa Ud, que esta recogida no comporta ningún peligro, ni para usted, ni para su hijo.

La sangre del cordón umbilical será empleada exclusivamente para investigación y en ningún caso se producirá manipulación genética alguna (mutación dirigida, clonación).

Los datos sobre la sangre del cordón serán incluidos de forma codificada en las bases de datos de nuestro laboratorio y la información podrá ser intercambiada con otros datos similares de otros países. Todos los datos serán tratados de forma confidencial.

No se entregará ninguna indemnización económica ni de ningún otro tipo por la donación de la misma.



HOJA DE INFORMACIÓN SOBRE LA DONACIÓN DE SANGRE PERIFÉRICA DE MUJERES EMBARAZADAS PARA FINES DE INVESTIGACIÓN (ANEXO 4)

FINALIDAD DEL PRESENTE ESTUDIO

Como resultado del esfuerzo de la creación y coordinación de un equipo multidisciplinar que incluye las instituciones del Instituto de Salud Carlos III y del Hospital Clínico de San Carlos de Madrid, se ha puesto en marcha una línea de investigación desde el año 2005 aprobada y financiada por el Ministerio de Sanidad (Proyectos CP04/0026; PI05/338 y MPY1180/06) y que se continúa en el proyecto titulado: “Modulación de la respuesta inmune mediante el uso de células madre y dendríticas de cordón umbilical, sangre periférica y eritrocitos nucleados fetales. Su aplicación al trasplante de órgano sólido y tejidos” cuyo investigador principal es el Dr. Jorge Martínez Laso, Jefe de la Unidad de Inmunoterapia celular del Instituto de Salud Carlos III (Campus de Majadahonda, Tfno: 918223715, e-mail: jmlaso@isciii.es) con fondos de la Fundación Mutua Madrileña con el objetivo del uso de la sangre periférica de mujeres embarazadas para terapias de regeneración celular inmunológica.

INFORMACIÓN GENERAL

Durante el embarazo, la sangre periférica de la mujer embarazada contiene eritrocitos fetales nucleados. Este tipo particular de células tiene dos características fundamentales que los hacen especiales para su estudio: 1. Tienen núcleo a diferencia de los de sangre periférica normal y 2. Poseen la capacidad de no ser destruidos por el sistema inmune materno. Estas características los hacen ideales para el estudio de sus características inmunomoduladores frente al rechazo y serían una fuente de conocimientos para ser usados en tratamientos terapéuticos frente al rechazo de trasplantes y en la regulación de los procesos inmunológicos de enfermedades inflamatorias crónicas.

Interés terapéutico y científico deducido del estudio de los eritrocitos fetales en sangre periférica materna:

Actualmente, los eritrocitos fetales presentes en sangre periférica materna se empiezan a usar como herramienta para el diagnóstico prenatal de enfermedades de origen genético sin tener que acudir a procesos como la amniocentesis o la extracción de vellosidades coriales que llevan asociado un cierto riesgo de aborto.

En nuestro caso, vamos a realizar un estudio de caracterización inmunológica de estas células ya que desde la octava semana de embarazo aparecen en la circulación sanguínea materna y perviven sin ser destruidos por el sistema inmune materno. Como se sabe la mitad de la dotación genética del bebé corresponde al padre y por lo tanto es extraña a la madre. Esta falta de compatibilidad entre el bebé y la madre tendría que ser reconocida por la misma como un cuerpo extraño y ser destruida en un mecanismo de rechazo similar al de un trasplante de órgano sólido. Como está demostrado, esto no sucede por lo que tiene que haber mecanismos de inhibición de respuesta inmune materno-fetal. El descubrimiento de estos mecanismos daría lugar al desarrollo de nuevas terapias anti-rechazo en los trasplantes y en los tratamientos de enfermedades inflamatorias crónicas.

Procedimiento de la donación de la sangre del cordón umbilical

La sangre periférica de la mujer embarazada se recoge exactamente igual que la de una analítica convencional y se aprovechará la realización de la misma para no tener que hacer ningún pinchazo adicional a la madre. Como se deduce no existe ningún riesgo ni peligro para la madre o el bebé.

La sangre de la donación I será empleada exclusivamente para investigación y en ningún caso se producirá manipulación genética alguna (mutación dirigida, clonación)

Los datos sobre la sangre donada serán incluidos de forma codificada en las bases de datos de nuestro laboratorio y la información podrá ser intercambiada con otros datos similares de otros países. Todos los datos serán tratados de forma confidencial.

No se entregará ninguna indemnización económica ni de ningún otro tipo por la donación de la misma.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Ober, C. HLA and pregnancy: The paradox of the allograft. *Am J Hum Genet* 1998;62:1-5.
- ² Le Boutellier P, Blaschitz A. The functionality of HLA-G is emerging. *Immunol Rev* 1999;167:233-244.
- ³ Hviid, TV. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. *Hum. Reprod. Update* 2006;12:209-232.
- ⁴ Rouas-Freiss N, Goncalves RN, Menier C, Dausset J, Carosella ED. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:11520-25.
- ⁵ García Lechuz M. Los agentes infecciosos en la etiopatogenia de las enfermedades reumáticas. *Reumatología Clínica* 2008;4(3):3-5.
- ⁶ Mitra R, Singh S, Khar A. Antitumor immune responses. *Exp Rev Mol Med* 2003; 5:1-22.
- ⁷ Bonilla FA, Bernstein IL, Khan A, Ballas ZK, Chinen J, Frank MM. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2005;94:1-63.
- ⁸ Litman GW, Rast JP, Shambrot MJ, Haire RN, Hulst M, Roess W, Litman RT, Hinds-Frey KR, Zilch A, Amemiya CT. Phylogenetic diversification of immunoglobulin genes and the antibody repertoire. *Mol Biol Evol* 1993;10(1): 60-72.
- ⁹ Shurin MR, Lu L, Kalinski R. Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy. *Springer Semin. Immunopathol* 1999;21:339-359
- ¹⁰ Lang P, Bader P, Schumm M. Transplantation of a combination of CD133 and CD34 selected progenitor cells from alternative donors. *Br J Haematol* 2004; 24:72-79.
- ¹¹ Crespo I, Paiva A, Couceiro A, Pimentel P, Orfao A, Regateiro F. Immunophenotypic and functional characterization of cord blood dendritic cells. *Stem Cells Dev* 2004;13(1):63-70.
- ¹² Borrás FE, Matthews NC, Patel R, Navarrete C. Dendritic cells can be successfully generated from CD34+ cord blood cells in the presence of autologous cord blood plasma. *Bone Marrow transplant* 2000;26:371-376.
- ¹³ Rizzo R, Melchiorri L, Stignani M, Baricordi OR. HLA-G expression is a fundamental prerequisite to pregnancy. *Hum Immunol* 2007;68:244-250.

- ¹⁴ Vico I. Inmunología y embarazo. En: clase de residentes. Servicio de Obstetricia y Ginecología Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada 2007;1-24.
- ¹⁵ Hammer A, Hutter H, Dohr G. HLA class I expression on the materno-fetal interface. *Am J Reprod Immunol* 1997;38:150-157.
- ¹⁶ Carosella ED, Rouas-Freiss N, Paul P, Dausset J. Cómo escapa el feto a las defensas de su madre. *Mundo Científico* 1998;190:24 -26.
- ¹⁷ Jurisicova A, Casper RF, MacLusky NJ, Mills GB, Librach CL. HLA-G expression during preimplantation human embryo development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:161-165.
- ¹⁸ Rabreau M, Rouas-Freiss N, Landi M, Le Danff C, Carosella ED. HLA-G expression in trophoblast cells is independent of embryonic development. *Hum Immunol* 2000;61:1108-1112.
- ¹⁹ Kanai T, Fujii T, Unno N. Human leukocyte antigen-G-expressing cells differently modulate the release of cytokines from mononuclear cells present in the decidua versus peripheral blood. *Am. J. Reprod. Immunol* 2001;45:94-99.
- ²⁰ Kanellopoulos-langevin C, Caucheteux SM, Verbeke P, Ojcius DM. Tolerance of the fetus by the maternal immune system: role of inflammatory mediators at the feto-maternal interface. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:121-129.
- ²¹ Le Bouteiller P. HLA-G in the human placenta: expression and potential functions. *Biochem Soc Trans* 2000;28:208-212.
- ²² Loke Y, King A. HLA class I molecules in implantation. *Fetal and Maternal Medicine Review* 2001;12:299-314.
- ²³ Carter AM, Enders AC. Comparative aspects of trophoblast development and placentation. *Reprod Biol Endocrinol* 2004;2:1186-1190.
- ²⁴ Zhao Y, Li X. Cross-immune tolerance: conception and its potential significance on transplantation tolerance. *Cell Mol Immunol* 2010;7:20-25.
- ²⁵ Erlebacher A. Immune surveillance of the maternal/fetal interface: controversies and implications. *Trends Endocrinol Metabol* 2010;21:428-434.
- ²⁶ Rodgers J, Cook, R. MHC class Ib molecules bridge innate and acquired immunity. *Nature Reviews Immunol* 2005;5:459-471.
- ²⁷ McMaster M, Librach C, Zhou Y, Lim K, Janartour M, De Mars R. Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblast. *J Immunol* 1995;154:3771-3778.

- ²⁸ Thellin O, Coumans B, Zorzi W, Igout A, Heinen E. Tolerance to the foeto-placental 'graft': ten ways to support a child for nine months. *Current Opinion in Immunology* 2000;12:731-737.
- ²⁹ Colbert GT, Chiang MH, Main EK. Expression of the nonclassical histocompatibility antigen HLA-G by preeclamptic placenta. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170(5):1244-1250.
- ³⁰ Veenstra van Nieuwenhoven AL, Heineman MJ, Faas MM. The immunology of successful pregnancy. *Hum Reprod Update* 2003;9:347-357.
- ³¹ Carosella E, Moreau P, Aractingi S, Rouas-Freiss N. HLA-G: a shield against inflammatory aggression. *Trends in Immunology* 2000;22(10):553-555.
- ³² Carosella E, Moreau P, Maoult J, Discorde M, Dausset J. HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. *Advances in immunology* 2003; 81:199-252.
- ³³ Falfan R. MHC: Polimorfismos genéticos en autoinmunidad. *Rev Inst Nac Enf Resp Mex* 2004;17(2):126-134.
- ³⁴ Kovats S, Main EK, Librach C. A class I antigen, HLA, expressed in human trophoblasts. *Science* 1990;248:220-223.
- ³⁵ Soares MJ, Chakraborty D, Karim MA, Konno T, Renaud SJ. Rat placentation: An experimental model for investigating the hemochorial maternal-fetal interface. *Placenta* 2012; 33(4):233-243.
- ³⁶ Hunt J, Petroff M, Morales P, Sedmayr P, Geraghty DE, Ober C. HLA-G in reproduction: Studies on the maternal-fetal interface. *Hum Immunol* 2000;61: 1113-1117.
- ³⁷ Heikkinen J, Möttönen M, Alanen A, Lassila O. Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human deciduas. *Clin Exp Immunol* 2004;136:373-378.
- ³⁸ Kirszenbaum M, Moreau P, Gluckman E, Dausset J, Carosella E. An alternatively spliced form of HLA-G mRNA in human trophoblasts and evidence for the presence of HLA-G transcript in adult lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4209-4213.
- ³⁹ Fernandez N, Cooper J. A critical review of the role of the major histocompatibility complex in fertilization, preimplantation development and fetomaternal interactions. *Reprod Hum Update* 1999;3:234-248.
- ⁴⁰ Mor G, Abrahams VM. Trophoblast cells as immune regulators. *Immunology of Pregnancy* 2006;10:215-228.

- ⁴¹ Bouteiller P, Tabiasco J, Parinaud J. Soluble HLA-G and embryo implantation: frequently asked questions. *Gynecol Obstet Invest* 2007;64(3):134-137.
- ⁴² Loke Y, King A. HLA class I molecules in implantation. *Fetal and Maternal Medicine Review* 2001;12:299-314.
- ⁴³ Carosella ED, Favier B, Rouass-Freiss N, Moreau P, Lemaoult J. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. *Blood* 2008;111: 4862-4870.
- ⁴⁴ Hackmon R, Hallak M, Krup M, Weitzman E, Sheiner B. HLA-G antigen and parturition: maternal serum, fetal serum and amniotic fluid levels during pregnancy. *Fetal Diagn Ther* 2004;19:404-409.
- ⁴⁵ Solier C, Aguerre-Girr M, Lenfant F, et al. Secretion of pro-apoptotic intron 4 retaining soluble HLA-G1 by human villous trophoblast. *Eur J Immunol* 2002;32: 3576-3586.
- ⁴⁶ Puppo F, Contini P, Ghio M, Indiveri F. Soluble HLA class I molecules/CD8 ligation trigger apoptosis of CD8+ cells by Fas/Fas-ligand interaction. *Scientific World Journal* 2002;12(2):421-423.
- ⁴⁷ Fanchin R, Gallot V, Rouas-Freiss N, Frydman R, Carosella E. Implication of HLA-G in human embryo implantation. *Human Immunology* 2007;68(4):259-263.
- ⁴⁸ Marchal-Bras-Goncalves R, Rouas-Freiss N, Connan F. A soluble HLA-G protein that inhibits natural Killer cell mediated cytotoxicity. *Transplant Proc* 2001; 33:2355-2359.
- ⁴⁹ Le Rond S, Le Maoult J, Creput C, Menier C, Deschamps M, Le Friec G, Amiot L, Durrbach A, Dausset J, Carosella ED, Rouas-Freiss N. Alloreactive CD4 and CD8 T cells express the immunotolerant HLA-G molecule in mixed lymphocyte reactions: in vivo implications in transplanted patients. *Eur J Immunol* 2004;34: 649-660.
- ⁵⁰ Mandelboim O, Pazmany L, Davis DM, Vales-Gomez M, Reyburn H, Rybalov B, Strominger JL. Multiple receptors for HLA-G on human natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997;94:14666-14670.
- ⁵¹ LeMaoult J, Zafaranloo C, Le Danff C, Carosella ED. HLA-G up regulates ILT2, ILT3, ILT4 and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells and T cells. *Faseb* 2005;19:662-664.
- ⁵² Sullivan LC, Clements CS, Rossjohn J, Brooks AG. The mayor histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E at the interface between innate and adaptive immunity. *Tissue antigens* 2008;72(5):415-424.

- ⁵³ Petrie EJ, Clements CS, Lin J, Sullivan LC, Johnson D, Huyton T, Heroux A, Hoare HL, Beddoe T, Reid HH. CD94-NKG2A recognition of human leukocyte antigen (HLA-E) bound to an HLA class I leader sequence. *J Exp Med* 2008;205 (3):725-735.
- ⁵⁴ Lefebvre S, Antoine M, Uzan S, et al. Specific activation of the non classical class I histocompatibility HLA-G antigen and expression of the ILT2 inhibitory receptor in human breast cancer. *J Pathol* 2002;96:266-274.
- ⁵⁵ Contini P, Ghio M, Poggi A. Soluble HLA-A, B, C and G molecules induce apoptosis in T and NK CD8 cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. *Eur J Immunol* 2003;33:125-134.
- ⁵⁶ LeMaout J, Caumartin J, Daouya M, Favier B, Le Rond L, González a, Carosella ED. Immune regulation by pretenders: cell-to-cell transfers of HLA-G make effector T cells act as regulatory cells. *Blood* 2007;109:2040-2048.
- ⁵⁷ Lefebvre S, Moreau P, Guiard V. Molecular mechanisms controlling constitutive and IFN-gamma-inducible HLA-G expression in various cell types. *J Reprod Immunol* 1999;43:213-214.
- ⁵⁸ Bainbridge DRJ, Ellis SA, Sargent I. HLA-G suppresses proliferation of CD4 T lymphocytes. *J. Reprod.Immunol* 2000;48(1):17-26.
- ⁵⁹ Grasso E, Baudou F, Fraccaroli L, Haulk V, Paparini D, Pérez-Leiróz C, Ramhorst R. Un Nuevo enfoque del dialogo materno-fetal: los beneficios del reconocimiento de aloantígenos. *Química Viva* 2011;1(10):18-28.
- ⁶⁰ Shurin M.R, Lu L, Kalinski P, Stewart-Akers AM, Lotze MT. Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy. *Springer Semin. Immunopathol* 1999;21: 339-359.
- ⁶¹ Dinarello C.A. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000;118(2):503-508.
- ⁶² Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 2000;117:1162-1172.
- ⁶³ Dealtry G, O'Farrell MK, Fernandez N. The TH2 cytokine environment of the placenta. *Int Arch Allergy Immunol.* 2000;123(2):107-119.
- ⁶⁴ Chaouat G, Ledee-Bataille N, Dubanchet S, Zourbas S, Sandra O, Martal J. TH1/TH2 paradigm in pregnancy: paradigm lost? Cytokines in pregnancy/early abortion: Reexamining the TH1 /TH2 paradigm. *Int Arch Allergy Immunol.* 2004; 134(2):93-119.
- ⁶⁵ Reinhard G, Noll A, Schlebusch H, Mallmann P, Ruecker AV. Shifts in the TH1/TH2 balance during human pregnancy correlate with apoptotic changes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998;245(3):933-938.

- ⁶⁶ Sykes L, MacIntyre DA, Yap XJ, Ghee Teoh T, Bennett PR. The TH1:TH2 dichotomy of pregnancy and preterm labour. *Mediators Inflamm* 2012(2012), article ID 967629.
- ⁶⁷ Saverino D, Fabbi M, Bruno S, Zarcone D, Tenca C, Santoro G, Anastasi G, Cosman D, Grossi CE, Ciccone E. The CD85/LIR-1/ILT-2 inhibitory receptor is expressed by all human T lymphocytes and down-regulates their functions. *J. Immunol.* 2000;165:3742-3755.
- ⁶⁸ Bonnet EA. Maternal tolerance is not critically dependent on interleukin-4. *Immunology* 2001;103(3):382-389.
- ⁶⁹ Moreli JB, Cirino AN, Monaliza J, Vieira M, Mattos I. Interleukin 10 and tumor necrosis factor-Alpha in pregnancy: aspects of interest in clinical obstetrics. *Obstet Gynecol* 2012(2012), article ID 230742.
- ⁷⁰ Male V, Sharkey A, Masters L, Kennedy PR, Farrell LE, Moffett A. The effect of pregnancy on the uterine NK cell KIR repertoire. *Eur J Immunol* 2011;41(10):3017-3027.
- ⁷¹ Sawai K, Matsuzaki N, Kameda T, Hashimoto K, Okada T, Shimoya K, Nobunaga T, Taga T, Kishimoto T, Saji F. Leukemia inhibitory factor produced at the fetomaternal interface stimulates chorionic gonadotropin production: its possible implication during pregnancy, including implantation period. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80(4):1449-1456.
- ⁷² Yie SM, Xiao R, Librach CL. Progesterone regulates HLA-G gene expression through a novel progesterone response element. *Hum Reprod* 2006;21:2538-2544.
- ⁷³ Contini P, Ghio M, Merlo A, Poggi A, Indiveri F, Puppo F. Apoptosis of antigen-specific T lymphocytes upon the engagement of CD8 by soluble HLA class I molecules is Fas ligand/Fas mediated: evidence for the involvement of p56lck, calcium calmodulin kinase II, and calcium-independent protein kinase C signaling pathways and for NF-kB and NF-AT nuclear translocation. *J. Immunol.* 2005;175: 7244-7254.
- ⁷⁴ Richani K, Soto E, Romero R, Espinoza J, Chaiworapongsa T, Nien JK, Edwin S, Kim YM, Hong JS, Mazor M. Normal pregnancy is characterized by systemic activation of the complement system. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2005;17(4): 239-245.
- ⁷⁵ Shiina T, Inoko H, Kulski JK. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue Antigens* 2004;64:631-649.
- ⁷⁶ Instituto Nacional del Cáncer, de los Institutos Nacionales de Salud de los EEUU. www.cancer.gov.
- ⁷⁷ Carosella ED, Moreau P, LeMaout J, Rouas-Freiss N. HLA-G: from biology to clinical benefits. *Trends in immunology* 2008;29:125-132.

- ⁷⁸ Lashley LE, van der Westerlaken LA, Haasnoot GW, Drabbels JJ, Spruyt-Gerritse MJ, Scherion SA, Claas FH. Maternal HLA-C2 and 14 bp insertion in HLA-G is associated with recurrent implantation failure. *Tissue Antigens* 2014 Dec;84(6):536-544.
- ⁷⁹ Tan Z, Shon AM, Ober C. Evidence of balancing selection at the HLA-G promoter region. *Hum Mol Genet* 2005;14:3619-3628.
- ⁸⁰ Brand O, Gough S, Heward J. A schematic diagram showing the major genes within the HLA class II region. *Expert Rev in Molecular Medicine* 2005;7(23):1.
- ⁸¹ Kirszenbaun M, Djoulah S, Hors J, Prost SS, Dausset JJ, Carosella ED. Polymorphism of HLA-G gene and protein. *J Reprod Immunol* 1999;43:105-109.
- ⁸² Universidad Nacional del Nordeste, Facultad de Medicina de Argentina. www.med.unne.edu.ar.
- ⁸³ Juch H, Blaschitz A, Dohr G, Hutter H. HLA class I expression in the human placenta. *Wien Med Wochenschr* 2012;162(9-19):196-200.
- ⁸⁴ Rodríguez L, Giraldo MC, García N, Velásquez L, París SC, Álvarez C, García L. Frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1. *Biomédica* 2007;27:537-547.
- ⁸⁵ Torres MJ, Rodríguez JC. Los nuevos conocimientos sobre las moléculas HLA clase II y una mejor asignación de los órganos para trasplante. *Nefrología* 2002;1: 1-8.
- ⁸⁶ Parham P, Norman PJ, Abi-Rached L, Hilton HG, Guethlein LA. Review: Immunogenetics of human placentation. *Placenta* 2012;33:71-80.
- ⁸⁷ Lee Nelson J, Hughes K, Smith AG, Nisperos BB, Branchaud AM, Hansen J. Maternal fetal disparity in HLA class II alloantigens and the pregnancy-induced amelioration of rheumatoid arthritis. *N Engl Med* 1993;329:466-471.
- ⁸⁸ Geraghty DE, Koller BH, Orr HT. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segments. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:9145-9149.
- ⁸⁹ Bortolotti D, Gentili V, Rotola A, Cassai E, Rizzo R, Luca DD. Impact of HLA-G analysis in prevention, diagnosis and treatment of pathological conditions. *World J Methodol* 2014 Mar 26;4(1):11-25.
- ⁹⁰ Tan Z, Shon AM, Ober C. Evidence of balancing selection at the HLA-G promoter region. *Hum Mol Genet* 2005;14:3619-3628.
- ⁹¹ Morera LM, Alfonso ME, Ustariz C, García MA, Guerreiro AM, Lam RM. Antígenos de histocompatibilidad HLA-G y embarazo. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia* 2010;26(1):10-14.

- ⁹² Rebmann V, Da Silva Nardi F, Wagner B, Horn PA. HLA-G as a tolerogenic molecule in transplantation and pregnancy. *J Immunol Res* 2014. Epub 2014 Jul 21.
- ⁹³ Rizzo R, Baricordi OR. Focus on the importance of soluble human leukocyte antigen G as a marker for embryo selection in assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 2013 Dec;100(6). Epub 2013 Nov 1.
- ⁹⁴ Higgins D, Thompson J, Gibson T, Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, Clustal W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;22:4673-4680.
- ⁹⁵ Zhang Z, Li Y, Zhang LL, Jia LT, Yang XQ. Association of 14bp insertion/deletion polymorphism of the HLA-G gene in father with severe preeclampsia in Chinese. *Tissue Antigens* 2012;80(2):158-164.
- ⁹⁶ Mc Laren PJ, Ripke S, Pelak K, Weintrob AC, Patsopoulos NA, Jia X, Erlich RL, Lennon NJ, Kadie CM, Heckerman D, Gupta N, Haas DW, Deeks SG, Pereyra F, Walker BD, de Bakker PI. Fine-mapping classical HLA variation associated with durable host control of HIV-1 infection in African Americans. *Hum Mol Genet* 2012; July 17 [Epub head of print].
- ⁹⁷ Yamazaki A, Yasunami M, Ofori M, Horie H, Kikuchi M, Helegbe G, Takaki A, Ishii K, Omar AH, Hirayama K. Human Leukocyte antigen class I polymorphism influence the mild clinical manifestation of Plasmodium falciparum infection in Ghanaian children. *Hum Immunol* 2011;72(10):881-888.
- ⁹⁸ Calmus Y. Graft-versus-host disease following living donor liver transplantation: high risk when the donor is HLA-homozygous. *Hepatol* 2004;41:505-507.
- ⁹⁹ Wiendl H, Mitsdoerffer M, Hofmeister V, Wischusen J, Weiss EH, Dichgans J, Lochmuller H, Hohlfeld R, Melms A, Weller M. The non-classical MHC molecule HLA-G protects human muscle cells from immune-mediated lysis: implications for myoblast transplantation and gene therapy. *Brain* 2003;126:176-185.
- ¹⁰⁰ Claas F, Roeelen DL, Mukler A, Doxiadis LL, Oudshoorn M, Heemskerk M. Differential immunogenicity of HLA class I alloantigens for the humoral versus the cellular immune response: "Towards tailor-made HLA mismatching". *Hum Immunol* 2006;67:424-429.
- ¹⁰¹ Arrieta- Bolaños E, Salazar- Sánchez L. Tipificación molecular de los antígenos leucocitarios humanos, Estado del arte y perspectivas para los trasplantes de células madre en Costa Rica. *Acta med costarric* 2010;52(1):1-12.

- ¹⁰² Lila N, Carpentier A, Amrein C, Khilil-Daher I, Dausset J, Carosella ED. Implication of HLA-G molecule in heartgraft acceptance. *Lancet* 2000;355:2138.
- ¹⁰³ Pangault C, Le Friec G, Caulet-Maugendre S, Lena H, Amiot L, Guillot V, Onno M, Faucher R. Lung macrophages and dendritic cells express HLA-G molecules in pulmonary diseases. *Hum Immunol* 2002;63(2):83-90.
- ¹⁰⁴ Cao M, Yie SM, Liu J, Ye SR, Xia D, Gao E. Plasma soluble HLA-G is a potencial biomarker for diagnostic of colorrectal, gastric, esophageal and lung cancer. *Tissue antigens* 2011;78(2):120-128.
- ¹⁰⁵ Onno M, Pangault C, Le Friec g, Guilloux V, André P, Renée F. Modulation of HLA-G antigens expression by human cytomegalovirus: specific induction in activated macrophages harbouring human cytomegalovirus infection. *J. Immunol* 2000;164:6426-6434.
- ¹⁰⁶ Le Rond S, Azéma C, Krawice-Radanne I, Durrbach A, Guettier C, Carosella ED, Rouass-Freiss N. Evidence to support the role of HLA-G5 in allograft acceptance through induction of immunosuppressive/regulatory T cells. *J. Immunol* 2006;176:3266-3276.
- ¹⁰⁷ Gómez-Casado E, Martinez-Laso J, Arnaiz-Villena A. El sistema de histocompatibilidad humano (HLA) y el Trasplante Hepático. www.cirugiasanchinarro.com/pdf/libro/Gonzales03.pdf
- ¹⁰⁸ Spies T, Bresnahan T, Bahram M, Arnold S, Blanck D, Mellins G, Pious, E DeMars D. A gene in the human major histocompatibility complex class II region controlling the class I antigen presentation pathway. *Nature* 1990;348:744-747.
- ¹⁰⁹ Koller BH, Geraghty DE, Shimizu Y, De Mars R, Orr HT. HLA-E: a novel class I gene expressed in resting T lymphocytes. *J Immunol* 1988;141:897-904.
- ¹¹⁰ Loustau M, Wiendl H, Ferrone S, Carosella ED. HLA-G 2012 conference: the 15-year milestone update. *Tissue Antigens* 2013 Mar;81(3):127-36.
- ¹¹¹ Wei X, Orr HT. Differential expression of HLA-E, HLA-F and HLA-G transcripts in human tissue. *Hum Immunol* 1990;29:131-142.
- ¹¹² Navarro F, Llano M, Bellón T, Colonna M, Geraghty DE, López-Botet M. The ILT2 (LIL1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells. *Eur J Immunol* 1999;29(1): 277-283.
- ¹¹³ Ni Leet T, Llanos M, Carreteros M, Ishitant A, Navarro F, López-Botet M, Geraghty DE. HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc. Natl. Acad Sci USA* 1998;95:5199-5204.

- ¹¹⁴ Carosella ED, Pascale P, Moreau P, Rouas-Freiss N. HLA-G and HLA-E: fundamental and pathophysiological aspects. *Trends in Immunol* 2000;21(11): 532-534.
- ¹¹⁵ Geraghty DE, Wei X, Orr TH, Koller BH. Human leukocyte antigen F (HLA-F): an expressed HLA gene composed of a class I coding sequence linked to a novel transcribed repetitive elements. *J Exp Med* 1990;171:1-18.
- ¹¹⁶ Shiina T, Inoko H, Kulski JK. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue Antigens* 2004;64:631-649.
- ¹¹⁷ Thorsby E. Invited anniversary review: HLA associated diseases. *Hum Immunol* 1997;53(1):1-11.
- ¹¹⁸ Kasapoglu E, Oguz F, Kamali S, Gul A, Inanc M, Mahmut C, Meral K. Low frequency of HLA-B27 in ankylosing spondylitis patients from Turkey. *Joint Bone Spine* 2008;75(3):299-302.
- ¹¹⁹ Martinez-Borra J, Gonzalez S, López-Vazquez A, Gelaz MA, Bruges J, Kanga U, Mehra NK, Lopez-Larrea C. HLA-B27 alone rather than B-27 related class I haplotypes contributes to ankylosing spondylitis susceptibility. *Hum Immunol* 2000; 61(2):131-139.
- ¹²⁰ Nussbaum R, McInnes R, Willars H. Variación genética en los individuos y las poblaciones: mutación y polimorfismo. *Genética en Medicina* 2008;7:175-204.
- ¹²¹ Fugger L, Morling N, Ryder LP, Odum N, Svejgaard A. Technical aspects of typing for HLA-DP alleles using allele-specific DNA in vitro amplification and sequence-specific oligonucleotide probes: detection of single base mismatches. *J Immunol Meth* 1990;129(2):175-185.
- ¹²² Rouas-Freiss N, Moreau P, Carosella ED. HLA-G in cancer: a way to turn off the immune system. *Semin Cancer Biol* 2003;13:325-336.
- ¹²³ Paul P, Rouas-Freiss N, Khalil-Daher I, Moreau P. HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:4510-4515.
- ¹²⁴ Rouass-Freiss N, Moreau P, Menier C, Carosella ED. HLA-G in cancer: a way to turn off the immune system. *Semin Cancer Biol* 2003;13:325-336.
- ¹²⁵ Chang CC, Campoli M, Ferrone S. HLA class I defects in malignant lesions: What have we learned? *Keio J Med* 2003;52(4):220-229.
- ¹²⁶ Ugurel S, Rebmann V, Ferrone S, Tilgen W, Grosse-Wilde H, Reinhold U. Soluble human leukocyte antigen-G serum level is elevated in melanoma

patients and is further increased by interferon- α immunotherapy. *Cancer* 2001;92:369-376.

¹²⁷ Singer G, Rebmann V, Chen YC, Liu HT, Ali SZ, Reinsberg J, McMaster MT, Pfeiffer K, Chan DW, Waldelmann E, Grosse-Wilde H, Cheng CC, Kurman RJ, Shih I. HLA-G is a potential tumor marker in malignant ascites. *Clin Cancer Res* 2003;9:4460-4464.

¹²⁸ Shih IeM. Application of human leukocyte antigen-G expression in the diagnosis of human cancer. *Hum. Immunol* 2007;68(4):272-276.

¹²⁹ Davinson B, Elstrand MB, McMaster MT, Berner A, Kurman RJ, Risberg B, Trope CG, Shin I. HLA-G expression in effusions is a possible marker of tumor susceptibility to chemotherapy in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2005;96:42-47.

¹³⁰ Hansel DE, Rahman A, Wilentz RE, Shih I, McMaster MT, Yeo CJ, Maitra A. HLA-G upregulation in pre-malignant and malignant lesions of the gastrointestinal Tract. *In J Gastrointes Cancer* 2005;35:15-23.

¹³¹ Caumatin J, Favier B, Daouya M, Guillard C, Moreau P, Carosella ED, LeMaoult J. Trogocytosis-based generation of suppressive NK cells. *EMBO J* 2007;26:1423-1433.

¹³² Domaica CI, Fuertes MB, Rossi LE, Girart MV, Avila DE, Rabinovich GA, Zwirnet NW. Tumour-experienced T cells promote NK cell activity through trogocytosis of NKG2D and NKp46 ligands. *EMBO rep* 2009;10(8):908-915.

¹³³ Hudrisier D, Aucher A, Puaux AL, Bordier C, Joly E. Capture of target cell membrane components via trogocytosis is triggered by a selected set of surface molecules on T or B cells. *J Immunol* 2007;178(6):3637-3647.

¹³⁴ Lila N, Amrein C, Guillemain R, Chevalier P, Latremouille C, Fabiani JN, Carosella ED, Carpentier A. Human leukocyte antigen-G expression after heart transplantation is associated with a reduced incidence of rejection. *Circulation* 2002;105:1949-1954.

¹³⁵ Qiu J, Terasaki PI, Miller J, Cai J, Carosella ED. Soluble HLA-G expression and renal graft acceptance. *Am J Transplant* 2006;6(9):2152-2156.

¹³⁶ Nikaein A, Backman L, Jennings L, Levy M, Goldstein R, Gonwa T. HLA compatibility and liver transplant outcome. Improved patient survival by HLA and cross-matching. *Transplantation* 1994;58:786-792.

¹³⁷ Lazana I, Zoudiani A, Kokkinou D, Themeli M, Liga M, Papadaki H, Papachristou D, Spyrodonidis A. Identification of a novel HLA-G regulatory population in blood: expansion after allogenic transplantation and de novo HLA-

G expression at graft-versus-host disease sites. *Haematologica* 2012;97(9):1338-1347.

¹³⁸ Piancatelli D, Maccarone D, Liberatone G, Parzanese I, Clemente K, Azzarone R, Pisani F, Famulari A, Papola F. HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism in kidney transplant patients with metabolic complications. *Transplant Proc* 2009; 41(4):1187-1188.

¹³⁹ Creput C, Durrbach A, Charpentier B, Carosella ED, Rouass-Freiss N. HLA-G: immunoregulatory molecule involved in allograft acceptance. *Nephrologie* 2003; 24(8):451-456.

¹⁴⁰ Creput C, Le Friec G, Bahri R, Amiot L, Charpentier B, Carosella ED, Rouass-Freiss N, Durrbach A. Detection of HLA-G in serum and graft biopsy associated with fewer acute rejections following combined liver-kidney transplantation: possible implications for monitoring patients. *Hum Immunol* 2003;64(11):1033-1038.

¹⁴¹ Luque J, Torres MI, Aumente MD, Marín J, García-Jurado G, González R, Pascual D, Guerra N, López-Rubio F, Álvarez-López MR, Arizón JM, Peña J. Soluble HLA-G in Heart transplantation: their relationship to rejection episodes and immunosuppressive therapy. *Hum Immunol* 2006;67(4-5):257-263.

¹⁴² Rouass-Freiss N, LeMaoult P, Moreau P, Dausset J, Carosella ED. HLA-G in transplantation: A relevant molecule for inhibition of graft rejection? *Am J Transplant* 2003;(3):11-16.

¹⁴³ Qui J, Terasaki PI, Miller J, Mitutani K, Cai J, Carosella ED. Soluble HLA-G expression and renal graft acceptance. *Am J Transplant* 2006;6:2152-2156.

¹⁴⁴ Rifón JJ. Trasplante de progenitores hematopoyéticos. *An Sist Sanit Navar* 2006;29(2):137-152.

¹⁴⁵ Moreau P, Faure O, Lefebvre S. Glucocorticoid hormones upregulate levels of HLA-G transcripts in trophoblasts. *Transplant Proc* 2001;33:2277.

¹⁴⁶ Andersson M, Paabo S, Nilsson T, Peterson PA. Impaired intracellular transport of class I MHC antigens as a possible means for adenoviruses to evade immune surveillance. *Cell* 1985;43(1):215-222.

¹⁴⁷ Lozano JM, Gonzalez R, Kindelán M, Rouas-Freiss N, Caballos R, Dausset J, Carosella ED, Pena J. Monocytes and T lymphocytes in HIV-1- positive patients express HLA-G molecule. *AIDS* 2002;16:347-351.

¹⁴⁸ Onno M, Pangault C, Le Friec G, Guilloux V, André P, Fauchet R. Modulation of HLA-G antigens expression by human cytomegalovirus: specific

induction in activated macrophages harbouring human cytomegalovirus infection. *J Immunol* 2000;164:6426-6434.

¹⁴⁹ Fainardi E, Castellazzi M, Stignani M, Morandi F, Sana G, Gonzalez R, Pistoia V, Baricordi OR, Sokal E, Peña J. Emerging topics and new perspectives on HLA-G. *Cell Mol Life* 2011;68(3):433-451.

¹⁵⁰ Megret F, Modulation of HLA-G and HLA-E expression in human neuronal cells after rabies virus or herpes virus simplex type 1 infections. *Hum Immunol* 2007;68:294-302.

¹⁵¹ Huang J, Burke P, Yang Y, Seiss K, Beamon J, Cunt T, Toth I, Pereyra F, Lichterfeld M, Yu XG. Soluble HLA-G inhibits myeloid dendritic cell function in HIV-1 infection by interacting with leukocyte immunoglobulin-like receptor B2. *J Virol* 2010;84(20):10784-10791.

¹⁵² Fish K, Britt NW, Nelson JA. A novel mechanism for persistence of human cytomegalovirus in macrophages. *J. Virol* 1996;70:1855-1856.

¹⁵³ Lafon M, Prehaud C, Megret F, Lafage M, Mouillot G, Roa M, Moreau P, Rouas-Freiss N, Carosella ED. Modulation of HLA-G expression in human neural cells after neurotropic viral infections. *J Virol* 2005;79(24):15226-15237.

¹⁵⁴ Altfeld M, Addo M, Rosenberg E, Hecht F, Paul L, Vogel M, Yu X, Draenert R, Johnston M, Strick D, Allen T, Feeney M, Kahn J, Sekaly R, Levy J, Rockstroh J, Goulder P, Walker JR, Bruce D. Influence of HLA-B57 on clinical presentation and viral control during acute HIV-1 infection. *AIDS* 2003;17(18):2581-2591.

¹⁵⁵ Jin ZK, Xu CX, Tian PX, Xue W, Ding XM, Zheng J, Ding CG, Ge GQ, Mao TC, Lin Y. Impact of HLA-G 14-bp polymorphism on acute rejection and cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients from northwestern China. *Transpl Immunol* 2012. [Epub ahead of print].

¹⁵⁶ LeBouder F, Khoufache K, Menier C, Mandouri Y, Keffous M, Lejal N, Krawice-Radanne I, Carosella ED, Rouas-Freiss N, Riteau B. Immunosuppressive HLA-G molecule is unregulated in alveolar epithelial cells after influenza A virus. *Hum Immunol* 2009;70(12):1016-1019.

¹⁵⁷ Khosrotehrani K, Le Danff C, Reynaud-Mendel B, Dubertret L, Carosella ED, Aractingi S. HLA-G expression in atopic dermatitis. *J Inv Derm* 2001;117:750-752.

¹⁵⁸ Aractingi S, Briand N, Le Danff C, Viguier M, Bachelez V, Michel L, Dubertret L, Carosella ED. HLA-G and NK receptor are expressed in psoriatic skin. A possible pathway for regulating infiltrative T cells? *Am J Pathol* 2001;159(1):71-77.

- ¹⁵⁹ Wiendl H, Mitsdoerffer M, Hofmeister V, Wischhusen J, Weiss EH, Dichangs J, Lochmuller H, Hohlfeld R, Melms A, Weller M. The non-classical MHC molecule HLA-G protects human muscle cells from immune-mediated lysis: implications for myoblast transplantation and gene therapy. *Brain* 2003;126:176-85.
- ¹⁶⁰ Torres MI, López Casado MA, Rios A. New aspects in celiac disease. *World J Gastroenterol* 2007;28(13):1156-1161.
- ¹⁶¹ Tsianos EV, Katsanos KH, Tsianos VE. Role of genetics in the diagnosis and prognosis of Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 2012;18(2):105-118.
- ¹⁶² Zheng X, Li C, Xu D, Lin A, Bao W, Yang G, Yan W. Analysis of the plasma soluble human leukocyte antigen-G and interleukin-10 levels in childhood atopic asthma. *Hum Immunol* 2010;71(10):982-987.
- ¹⁶³ Verbruggen LA, Rebmann V, Demanet C, De Cock S, Grosse-Wilde H. Soluble HLA-G in rheumatoid arthritis. *Hum Immunol* 2006;67:561-567.
- ¹⁶⁴ Fainardi E, Rizzo R, Melchiorri L, Castellazzi M, Paolino E, Tola MR, Granieri E, Baricordi OR. Intrathecal synthesis of soluble HLA-G and HLA-I molecules are reciprocally associated to clinical and MRI activity in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2006 Feb;12(1):2-12.
- ¹⁶⁵ Hviid TV, Milman N, Hylenius S, Jakobsen K, Jensen MS, Larsen LG. HLA-G polymorphisms and HLA-G expression in sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 2006;23(1):30-37.
- ¹⁶⁶ Yang Y, Chu W, Geraghty DE, Hunt JS. Expression of HLA-G in human mononuclear phagocytes and selective induction by INF-gamma. *J Immunol* 1996; 156(11):4224-4231.
- ¹⁶⁷ Brenol CV, Veit TD, Chies JA, Xavier RM. The role of the HLA-G gene and molecule on the clinical expression of rheumatologic diseases. *Rev Bras Reumatol.* 2012;52(1):82-91.
- ¹⁶⁸ Mitsdoerffer M, Schreiner B, Kieseier BC, Neuhaus O, Dichgans J, Hartung HP, Weller M, Wiendl H. Monocyte-derived HLA-G acts as a strong inhibitor of autologous CD4 T cell activation and is upregulated by interferon-beta in vitro and in vivo: rationale for the therapy of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2005; 159(1-2):155-164.
- ¹⁶⁹ Baricordi OR, Stignani M, Melchiorri L, Rizzo R. HLA-G and inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2008;7(2):67-74.

- ¹⁷⁰ Baricordi OR, Govoni M, Rizzo R, Trotta F. In rheumatic arthritis, a polymorphism in the HLA-G gene concurs in the clinical response to metotrexate treatment. *Ann Rheum Dis*. 2007; 66(8):1125-1126.
- ¹⁷¹ Stamp LK, O'Donnell JL, Chapman PT, Barclay ML, Kennedy MA, Frampton CM, Roberts RL. Lack of association between HLA-G 14bp insertion/deletion polymorphism and response to long-term therapy with methotrexate response in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2009; 68(1):154-155.
- ¹⁷² Oztekin O. New insights into the pathophysiology of gestational diabetes mellitus: possible role of human leukocyte antigen-G. *Med Hypotheses*. 2007; 69(3):526-530.
- ¹⁷³ Abediankenari S, Eslami MB, Sarrafnejad A, Mohseni M, Larijani B. Dendritic cells bearing HLA-G inhibit T-cell activation in type 1 diabetes. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2007 Mar;6(1):1-7.
- ¹⁷⁴ Piccinni MP, Scaletti C, Maggi E, Romagnani S. Role of hormone-controlled TH1 and TH2 type cytokines in successful pregnancy. *J Neuroimmunol* 2000; 109(1):30-33.
- ¹⁷⁵ Heidari MH, Novin MG, Ahmadi F, Khorshid M, Najafi T, Molouki A, Salehpour S, Bandehpour M, Heidari M, Sato E. Increase in concentration of soluble HLA-G in high-quality embryos after intracytoplasmic sperm injection. *Anat Cell Biol*. 2011 Dec;44(4):331-336.
- ¹⁷⁶ Jee BC, Suh CS, Kim SH, Moon SY. Soluble human leukocyte antigen G level in fluid from single dominant follicle and the association with oocyte competence. *Yonsei Med J*. 2011;52(6):967-971.
- ¹⁷⁷ Warner CM, Lampton PW, Newmark JA, Cohen J. Symposium: innovate techniques in human embryos viability assessment. Soluble human leukocyte antigen- G and pregnancy success. *Reprod Biomed Online*. 2008;17(4):470-485.
- ¹⁷⁸ Rebmann V, Switala M, Eue I, Schwahn E, Merzenich M, Grosse-Wilde H. Rapid evaluation of soluble HLA-G levels in supernatants of in vitro fertilized embryos. *Hum Immunol*. 2007;68(4):251-258.
- ¹⁷⁹ Sargent I, Swales A, Ledee N, Kozma N, Tabiasco J, Le Bouteiller P. sHLA-G production by human IVF embryos: can it be measured reliably? *J Reprod Immunol*. 2007;75(2):128-132.
- ¹⁸⁰ Rizzo R, Fuzzi B, Stignani M, Criscuoli L, Melchiorri L, Dabizzi S, Campioni D, Lanza F, Marzola A, Branconi F, Noci I, Baricordi OR. Soluble HLA-G molecules in follicular fluid: a tool for oocyte selection in IVF? *J Reprod Immunol*. 2007;74(1-2):133-142.

- ¹⁸¹ Rizzo R, Dal Canto MB, Stignani M, Fadini R, Fumagalli D, Renzini MM, Borgatti M, Gambari R, Baricordi OR. Production of sHLA-G molecules by in vitro matured cumulus-oocyte-complex. *Int J Mol Med*. 2009; 24(4):523-530.
- ¹⁸² Szekeres-Bartho J, Halasz M, Palkovics T. Progesterone in pregnancy: receptor-ligand interaction and signalling pathways. *J Reprod Immunol*. 2009; 83(1-2):60-64.
- ¹⁸³ Ivanova-Todorova E, Mourdjeva M, Kyurkchiev D, Bochev I, Stoyanova E, Dimitrov R, Timeva T, Yunakova M, Bukarev D, Shterev A, Tivchev P, Kyurkchiev S. HLA-G expresión is up-regulated by progesterona in mesenchymal ítem cells. *Am J Reprod Immunol*. 2009;62(1):25-33.
- ¹⁸⁴ Buus S, Sette A, Colon S, Miles C, Grey H. The relation between major (MHC) restriction and the capacity of Ia to bind immunogenetic peptides. *Science* 1987; 235:1353 -1357.
- ¹⁸⁵ Estupiñán SM, Trujillo E. Complejo mayor de histocompatibilidad y desarrollo de vacunas. *Nova* 2004;2(2):59-70.
- ¹⁸⁶ Patarroyo ME, Romero P, Torres ML, Clavijo P, Moreno A, Martinez A. Induction of protective immunity against experimental infection with malaria using synthetic peptides. *Nature* 1995;328:629-632.
- ¹⁸⁷ Castillo F, Guerrero C, Trujillo E, Delgado G, Martinez P, Salazar LM. Identifying and structurally characterizing CD1b in Aotus nancymae owl monkeys. *Immunogenetics* 2004;56:480-489.
- ¹⁸⁸ De Vries RR. HLA and disease: past, present and future. *Neth J Med* 1994; 45(6):302-308.
- ¹⁸⁹ Hiby SE, King A, Sharkey A, Loke YW. Molecular studies of thophoblast HLA-G: polymorphism, isoforms, imprinting and expression in preimplantation embryo. *Tissue Antigens* 1999;53(1):1-13.
- ¹⁹⁰ Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, DeMars R. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* 1990;248(4952):220-223.
- ¹⁹¹ Lefebvre S, Adrian F, Moreau P, Gourand L, Dausset J, Berrih-Aknin S, Carosella ED, Paul P. Modulation of HLA-G expression in human thymic and amniotic cells. *Hum Immunol* 2000;61(11):1095-1101.
- ¹⁹² Le Discorde M, Moreau P, Sabatier P, Legeais JM, Carosella ED. Expression of HLA-G in human cornea, an inmune-privileged tissue. *Hum Immunol* 2003; 64(11):1039-1044.

- ¹⁹³ Cirulli V, Zalatan J, McMaster M, Prinsen R, Salomon DR, Ricordi C, Torbett BE, Meda P, Crisa L. The antigen class I HLA repertoire of pancreatic islets comprises the nonclassical class Ib antigen HLA-G. *Diabetes* 2006;55(5):1214-1222.
- ¹⁹⁴ LeBouteiller P, Fons P, Herault JP, Bono F, Chabot S, Cartwright JE, Bensussan A. Soluble HLA-G and control of angiogenesis. *J Reprod Immunol* 2007;76(1-2):17-22.
- ¹⁹⁵ Capittini C, Bergamaschi P, Sachetto S, Truglio M, Viola M, Marchesi A, Genovese V, Romano B. The plasma levels of soluble HLA-G molecules correlate directly with CD34+ cell concentration and HLA-G 14bp insertion/insertion polymorphism in cord blood donors. *Blood Transfus* 2014 Jan 12 Suppl 1:s361-6. Epub 2013 Jan 23.
- ¹⁹⁶ López-González AS, García-Girón C, Cavia Saiz M, López Muñoz A, García-González M, Coma MJ, Muñiz P. Inmunotolerancia en tumores gastrointestinales: HLA-G e Indolamina 2,3-dioxigenasa. *Rev. Electrón Biomed* 2007;3:59-65.
- ¹⁹⁷ Kirszenbaum M, Moreau P, Gluckman E. An alternatively spliced form of HLA-G mRNA in human trophoblasts and evidence for the presence of HLA-G transcript in adult lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4209-4213.
- ¹⁹⁸ Gros F, Sebt Y, De Guibert S. Soluble HLA-G molecules are increased during acute leukaemia, especially in subtypes affecting monocytic and lymphoid lineages. *Neoplasia* 2006;8:223-230.
- ¹⁹⁹ Gonzalez A, Alegre E, Torres MI, Díaz-Lagares A, Lorite P, Palomeque T, Arroyo A. Evaluation of HLA-G5 plasmatic levels during pregnancy and relationship with the 14-bp polymorphism. *Am J Reprod Immunol* 2010;64(5):367-374.
- ²⁰⁰ Paul P, Cabreste FA, Ibrahim EC. Identification of HLA-G7 as a new splice variant of the HLA-G mRNA and expression of soluble HLA-G5, -G6, and -G7 transcripts in human transfected cells. *Hum Immunol* 2000;61:1138-1149.
- ²⁰¹ Le Friec G, Gros F, Sebt Y. Capacity of myeloid and plasmacytoid dendritic cells especially at mature stage to express and secrete HLA-G molecules. *J Leukocyte Biol* 2004;76:1125-1133.
- ²⁰² Lefebvre S, Antoine M, Uzan S. Specific activation of the non classical class I histocompatibility HLA-G antigen and expression of the ILT2 inhibitory receptor in human breast cancer. *J Pathol* 2002;96:266-274.
- ²⁰³ Buzzi M, Alviano F, Campioni D, Stignani M, Melchiorri L, Rotola A, Tazzari P, Ricci F, Vaselli C, Terzi A, Pagliaro PP, Cuneo A, Lanza F, Bontadini A,

Baricordi OR, Rizzo R. Umbilical cord blood CD34+ cell-derived progeny produces human leukocyte antigen-G molecules with immuno-modulatory functions. *Hum Immunol* 2012;73(2):150-155.

²⁰⁴ Blaschitz A, Lenfant F, Mallet V, Hartmann M, Bensussan A, Geraghty DE et al. Endotelial cells in chorionic fetal vessels of first trimester placenta express HLA-G. *Eur J Immunol* 1997;27:3380-3388.

²⁰⁵ Fuzzi B, Rizzo R, Criscuoli L, Noci I, Melchiorri L, Scarselli B, Bencini E, Menicucci A, Baricordi O. HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy. *Eur J Immunol* 2002;32(2):311-315.

²⁰⁶ LeMaout J, Rouas-Freiss N, Carosella ED. HLA-G5 expression by trophoblast cells: the facts. *Mol Hum Reprod* 2005;11(10):719-722.

²⁰⁷ Yang Y, Chu W, Geraghty DE, Hunt JS. Expression of HLA-G in human mononuclear phagocytes and selective induction by INF-gamma. *J Immunol* 1996; 156(11):4224-4231.

²⁰⁸ Darmochwal-Kolarz D, Kolarz B, Rolinski J, Leszczynska-Gorzela B, Oleszczuk J. The concentrations of soluble HLA-G protein are elevated during mid-gestation and decreased in pre-eclampsia. *Folia Histochem Cytobiol* 2012;50 (2):286-291.

²⁰⁹ Zhao SC, Li ZB, He TQ, Yu CZ. Relationship between the expression of human leukocyte antigen G and Preeclampsia. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2011;46(10):758-762.

²¹⁰ Zhang Z, Li Y, Zhang LL, Jia LT, Yang XQ. Association of 14 bp insertion/deletion polymorphism of the HLA-G gene in father with severe Preeclampsia in Chinese. *Tissue Antigens* 2012;80(2):158-164.

²¹¹ Dahl M, Hviid TV. Human leukocyte antigen class IB molecules in pregnancy success and early pregnancy loss. *Hum Reprod Update* 2012;18(1):92-109.

²¹² Berger DS, Hogge WA, Barmada MM, Ferrell RE. Comprehensive analysis of HLA-G: implications for recurrent spontaneous abortion. *Reprod Sci* 2010;17(4): 331-338.

²¹³ Kolte AM, Steffensen R, Nielsen HS, Hviid TV, Christiansen OB. Study of the structure and impact of human leukocyte antigen HLA-G-A, HLA-G-B and HLA-G-DRB1 haplotypes in families with recurrent miscarriage. *Hum Immunol* 2010; 71(5):482-488.

²¹⁴ Shaikly VR, Morrison IE, Taranissi M, Noble CV, Withey AD, Cherry RJ, Blois SM, Fernandez N. Analysis of HLA-G in maternal plasma, follicular fluid,

and preimplantation embryos reveal an asymmetric pattern of expression. *J Immunol* 2008;180(6):4330-4337.

²¹⁵ Vercammen M, Verloes A, Haentjens P, Van de Velde H. Can soluble human leukocyte antigen-G predict successful pregnancy in assisted reproductive technology? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2009;21(3):285-290.

²¹⁶ Ronin-Walknowska E, Sipak-Szmigiel O. Immunological aspects of premature termination of pregnancies. *Med Wieku Rozwoj* 2003;7(3 Suppl 1):65-78.

²¹⁷ Steinborn A, Rebmann V, Scharf A, Sohn C, Grosse-Wilde H. Placental abruption is associated with decreased maternal plasma levels of soluble HLA-G. *J Clin Immunol* 2003;23(4):307-314.

²¹⁸ Kyurkchiev S, Gandolfi F, Hayrabedyan S, Brevini TA, Dimitrov R, Fitzgerald JS, Jabben A, Mourdjeva M, Photini SM, Spencer P, Fernandez N, Markert UR. Stem cells in the reproductive system. *Am J Reprod Immunol* 2012;67(6):445-462.

²¹⁹ Gebler A, Zabel O, Seliger B. The immuno-modulatory capacity of mesenchymal stem cells. *Trends Mol Med*. 2012;18(2):128-134.

²²⁰ Kanematsu D, Shofuda T, Yamamoto A, Ban C, Ueda T, Yamasaki M, Kanemura Y. Isolation and cellular properties of mesenchymal cells derived from the deciduas of human term placenta. *Differentiation* 2011;82(2):77-78.

²²¹ Lang P, Bader P, Schumm M, Feuchtinger T, Einsele H, Fuhrer M, Weinstock C, Handgretinger R, Kuci S, Martin D, Niethammer D, Greil J. Transplantation of a combination of CD133 and CD34 selected progenitor cells from alternative donors. *Br J Haematol* 2004;24:72-79.

²²² Bornhäuser M, Eger L, Oelschlaegel U, Auffermann-Gretzinger S, Kiani A, Schetelig J, Illmer T. Rapid reconstitution of dendritic cells after allogeneic transplantation of CD133 selected haematopoietic stem cells. *Leukemia* 2005;19:161-165.

²²³ Banchereau J, Briere F, Caux C, D J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767-811.

²²⁴ Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olxeus J, Kearney J, Buck DW. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997;12:5002-5012.

²²⁵ Gallacher M, Murdoch B, Wu DM, Karanu FN, Keeney M, Bhatia M. Isolation and characterization of human CD34(-)Lin(-) and CD34(+)Lin(-) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood*. 2000;95:2813-20.

- ²²⁶ Lang P, Bader P, Schumm M, Feuchtinger T, Einsele H, Fuhrer M, Weinstock C, Handgretinger R, Kuci S, Martin D, Niethammer D, Greil J. Transplantation of a combination of CD133+ and CD34+ selected progenitor cells from alternative donors. *Br J Haematol* 2004;124:72-79.
- ²²⁷ Florek M, Haase M, Marzesco AM, Freund D, Ehninger G, Huttner WB, Corbeil D. Prominin-1/CD133, a neural and hematopoietic stem cell marker, is expressed in adult human differentiated cells and certain types of kidney cancer. *Cell Tissue Res* 2005;319:15-26.
- ²²⁸ Aoki M, Yasutake M, Murohara T. Derivation of functional endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood mononuclear cells isolated by a novel cell filtration device. *Stem Cells* 2004;22:994-1002.
- ²²⁹ Quirici N, Soligo D, Caneva L, Servida F, Bossolasco P, Deliliers GL. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133 (+) cells. *Br J Haematol* 2001;115:186-94.
- ²³⁰ Charrier S, Boiret N, Fouassier M, Berger J, Rapatel C, Pigeon P, Mareynat G, Bonhomme J, Camilleri L, Berger MG. Normal human bone marrow CD34(+)CD133(+) cells contain primitive cells able to produce different categories of colony-forming unit megakaryocytes in vitro. *Exp Hematol* 2002;30:1051-1060.
- ²³¹ Jang YK, Park JJ, Lee MC, Yoon BH, Yang YS, Yang SE, Kim SU. Retinoic acid-mediated induction of neurons and glial cells from human umbilical cord-derived hematopoietic stem cells. *J Neurosci Res* 2004;75:573-584.
- ²³² Ruzicka S, Grskovic B, Pavlovic V, Qujeg D, Karimi A, Mueller MM. Differentiation of human umbilical cord blood CD133+ stem cells towards myelo-monocytic lineage. *Clin Chim Acta* 2004;343:85-92.
- ²³⁴ Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2004. *Tissue Antigens* 2005;65:301-69.
- ²³⁵ Creput C, Durrbach A, Menier C, et al. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in biliary epithelial cells is associated with allograft acceptance in liver-kidney transplantation. *J Hepatol* 2003;39:587-94.
- ²³⁶ Borrás FE, Matthews NC, Patel R, Navarrete C. Dendritic cells can be successfully generated from CD34+ cord blood cells in the presence of autologous cord blood plasma. *Bone Marrow transplant* 2000;26:371-376.
- ²³⁷ Castro MJ, Morales P, Martínez-Laso J, Allende L, Rojo-Amigo R, González-Hevilla M, Varela P, Moscoso J, García-Berciano M, Arnaiz-Villena A. Lack of MHC-G4 and soluble (G5,G6) isoforms in the higher primates, Pongidae. *Hum Immunol* 2000;61:1164-1168.

- ²³⁸ Paul P, Rouas-Freiss N, Moreau P, Cabestre FA, Menier C, Khalil-Daher I, Pangault C, Onno M. HLA-G, E, F preworkshop: tools and protocols for analysis of non-classical class I genes transcription and protein expression. *Hum Immunol* 2000;61:1177-1195.
- ²³⁹ Miyagi T, Tatsumi T, Takehara T, Kanto T, Kuzushita N, Sigimoto Y, Jinushi M, Kasahara A, Sasaki Y, Hori M, Hayashi N. Impaired expression of proteasome subunits and human leukocyte antigens class I in human clon cancer cells. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:32-40.
- ²⁴⁰ Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 2004;5: 150-163.
- ²⁴¹ Robinson J, Waller MJ, Parham P, de Groot N, Bontrop R, Kennedy LJ, Stoehr P, Marsh SG. IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of the major histocompatibility complex. *Nucl Acids Res* 2003;31:311-314.
- ²⁴² Higgins D, Thompson J, Gibson T, Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, Clustal W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;22:4673-4680.

**ARTÍCULOS ORIGINALES QUE CONTIENEN EN MODO PARCIAL LOS
RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRESENTE TESIS DOCTORAL**

- ²⁴³ **Martínez-Laso J**, De Juan D, Martínez-Quiles N, Gómez-Casado E, Cuadrado E, Arnaiz-Villena A. The contribution of the HLA-A, -B, -C and -DR, -DQ DNA typing to the study of the origins of Spaniards and Basques. *Tissue Antigens* 1995; 45:237-245.
- ²⁴⁴ **Martínez-Laso J**, Gazit E, Gómez-Casado E, Morales P, Martínez-Quiles N, Alvarez M, Martín-Villa JM, Fernández V, Arnaiz-Villena A. HLA-DR and DQ polymorphism in Ashkenazi and non-Ashkenazi Jews: comparison with other Mediterraneans. *Tissue Antigens* 1996;47:63-71.
- ²⁴⁵ Arnaiz-Villena A, **Martínez-Laso J**, Gómez-Casado E, Díaz-Campos N, Santos P, Martinho A, Breda-Coimbra E. Relatedness among Basque, Portuguese, Spaniards and Algerians studied by HLA allelic frequencies and haplotypes. *Immunogenetics* 1997;47:37-43.
- ²⁴⁶ Gómez-Casado E, Del Moral P, **Martínez-Laso J**, García-Gómez A, Allende L, Silvera- Redondo C, Longas J, González-Hevilla M, Arnaiz-Villena A. HLA genes in Arab-speaking Moroccans: close relatedness to Berbers and Iberians. *Tissue Antigens* 2000;55:239-249.
- ²⁴⁷ Cervera I, Herraiz MA, Peñaloza J, Barbolla ML, Jurado ML, Macedo J, Vidart JA, **Martínez-laso, J**. Human antigen-G allele polymorphisms have evolved following three different evolutionary lineages based on intron sequences. *Human Immunology* 2010;71:1109-15.
- ²⁴⁸ Arnaiz-Villena A, **Martínez-Laso J**, Serrano-Vela J. HLA-G polymorphism and evolution. *Tissue Antigens* 2007;1:156-159.
- ²⁴⁹ **Martínez -Laso J**, Moscoso J, Zamora J, Gomez-Casado E, Arnaiz-Villena A. Generation of the B*41 group of alleles as indicated by intron sequences. *Tissue Antigens* 2006;67:70-74.
- ²⁵⁰ Roman A, Cervera I, Head J, Rodriguez M, **Martínez-Laso J**. Generation of HLA-B*1516/B*1567/B*1595 and B*1517 alleles (B15 specific group) by transpecies evolution. *Hum Immunol* 2007;68:1001-1008.
- ²⁵¹ Gómez-Casado E, **Martínez-Laso J**, Vargas-Alarcón G, Varela P, Díaz-Campos N, Álvarez M, Arnaiz-Villena, A. Description of a new HLA-E (E*01031) allele and its frequency in the Spanish population. *Hum Immunol* 1997; 54: 69-73.

- ²⁵² Román A, Rodríguez M, Herraiz MA, Jordá J, Cervera I, Peñaloza J, Vidart JA, **Martínez-Laso J**. Heterogeneous expression of HLA-G1, G2, G5, G6 and G7 in myeloid and plasmacytoid dendritic cells isolated from umbilical cord blood. *Hum Immunol* 2009;70(2):104-9.
- ²⁵³ Román A, Cervera I, Head J, Rodríguez M, Fuentes P, Gutierrez-Solar B, **Martínez-Laso J**. Generation of HLA-B*1516/B*1517 group of alleles from non human primates. *Hum Immunol*. 2008;68:1001-1008.
- ²⁵⁴ **Martínez-Laso J**, Herraiz MA, Vidart JA, Peñaloza J, Barbolla ML, Jurado ML, Cervera I. Polymorphism of the HLA-B*15 group of alleles is generated following 5 lineages of evolution. *Hum Immunol* 2011;72(5):412-421.
- ²⁵⁵ **Martínez-Laso J**, Gómez-Casado E, Arnaiz-Villena A. HLA-G and HLA-G Typing. *Methods Mol Biol* 2003;210:223-36.
- ²⁵⁶ **Martínez-Laso J**, Herraiz MA, Peñaloza J, Barbolla ML, Jurado ML, Macedo J, Vidart J, Cervera I. Promoter Sequences confirm the three different evolutionary lineages described for HLA-G. *Hum Immunol* 2013 Mar 5;74(3):383-8.
- ²⁵⁷ Cervera I, Herraiz MA, Peñaloza J, Vidart J, **Martínez-Laso J**. The novel HLA-G*01:03:01:02 allele differs from G*01:03:01:01 by a possible inversion event in intron 3. *Tissue Antigens* 2011;78(2):159-60.
- ²⁵⁸ Cervera I, Herraiz MA, Román A, Vidart J, **Martínez-Laso J**. The novel HLA-G*01010302 allele differs from G*01010301 by a single nucleotide change in intron 5. *Tissue Antigens* 2009;74(5):463-464.
- ²⁵⁹ Cervera I, Herraiz MA, Vidart J, Peñaloza J, **Martínez-Laso J**. The HLA-B*83:01 allele is generated by a gene conversion event including whole of exon 2 and partial introns 1 and 2 between B*44 and B*56 alleles. *Int J Immunogenet* 2011 Feb;38(1):73-5.
- ²⁶⁰ Cervera I, Herraiz MA, Peñaloza J, Vidart J, **Martínez-Laso J**. A new allele, HLA-G*010120 is generated by a recombination event between HLA-G*01010101/02 and HLA-G*01010201. *Tissue Antigens* 2010;75(6):738-0.
- ²⁶¹ **Martínez-Laso J**, Moscoso J, Zamora J, Gomez-Casado E, Arnaiz-Villena A. Generation of the B*41 group of alleles as indicated by intron sequences. *Tissue Antigens* 2006;67(1):70-4.
- ²⁶² **Martínez-Laso J**, Moscoso J, Zamora J, Martín-Villa M, Lowy E, Vargas-Alarcón G et al. Different evolutionary pathway of B*570101 and B*5801 (B17 group) alleles based in intron sequences. *Immunogenetics* 2004;55:866-72.

- ²⁶³ **Martínez-Laso J**, Peñalosa J, Vidart J, Herraiz MA, Cervera I, Picazo JJ et al. HLA-G, -E and -F expression in myeloid and plasmacytoid dendritic cells from Umbilical Cord Blood. In: Mandell S, Hu T, Williams R, Olive D (eds). *Current research in Immunology 2*. Trivandrum: Research Media, 2008;27-42.
- ²⁶⁴ Morales P, Corell A, **Martínez-Laso J**, Martín-Villa JM, Varela P, Paz-Artal E et al. Three new HLA-G alleles and their linkage disequilibria with HLA-A. *Immunogenetics* 1993;38:323-31.